

Univerzita Karlova v Praze
Pedagogická fakulta
Katedra chemie a didaktiky chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Využití hmotnostní spektrometrie pro identifikaci insekticidních látek
v antiparazitických obojcích

The use of mass spectrometry for the identification of insecticides used
in collars

Linda Honskusová

Vedoucí práce: Ing. Mgr. Štěpánka Hrdličková Kučková, Ph.D.
Studijní program: Specializace v pedagogice
Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání
Výchova ke zdraví se zaměřením na vzdělávání

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Využití hmotnostní spektrometrie pro identifikaci insekticidních látek v antiparazitických obojcích vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně, za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne

.....

podpis

Považuji za svou milou povinnost poděkovat všem, kteří mi při zpracování bakalářské práce pomáhali, především Ing. Mgr. Štěpánce Hrdličkové Kučkové, Ph.D., za vedení při zpracování a za cenné a věcné připomínky a rady. Za pomocnou ruku také děkuji Ing. Petře Junkové. V neposlední řadě děkuji své rodině, bez které by mé studium nebylo umožněno a svým blízkým, kteří mě v tomto období podporovali.

ANOTACE

V této práci byly zkoumány insekticidy permethrin, (S)-methopren, fipronil, flumethrin a propoxur v antiparazitických přípravcích, které jsou běžně ke koupi ve specializovaných chovatelských potřebách. Tyto antiparazitické přípravky se používají u koček a psů jako prevence proti napadení endoparazity, jakými jsou blechy, klíšťata nebo komáři. Napadení parazity a ochrana před nimi představuje dlouhodobý problém nejen pro chovatele domácích zvířat, ale i pro odbornou veřejnost.

Pevné i tekuté vzorky antiparazitických přípravků byly podrobeny hmotnostní analýze ((MA)LDI-TOF, (matrix-assisted) laser desorption/ionization – time of flight) nejprve bez přítomnosti matrice: čisté, v roztoku s vodou a v roztoku s chloroformem. V druhé fázi byly vzorky podrobeny hmotnostní analýze s 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinou (DHB) matricí. Pevný vzorek byl převeden do roztoků s vodou, ethanolem, diethyletherem a hexanem. Vzorky byly podrobeny 10 minutové sonikaci a následně na 5 minut umístěny do stolní centrifugy.

V experimentální části této bakalářské práce bylo cílem vytvořit hmotnostní spektra a zjistit, zda je hmotnostní spektrometrie (MA)LDI-TOF vhodnou metodou pro identifikaci vybraných insekticidů.

KLÍČOVÁ SLOVA

insekticidy, paraziti, (MA)LDI-TOF MS, antiparazitické obojky, spot-on přípravky

ANNOTATION

In this work insecticides such as permethrin, (S)-methoprene, fipronil, propoxur and flumethrin were investigated by mass spectrometry. These compounds are used in antiparasitic products that are commonly available in specialized pet shops. The antiparasitic products are used as prevention for cats and dogs against infestations by endoparasites such as fleas, ticks and mosquitoes. Parasitic infestation and protection against them is a long-term issue not only to pet owners, but also to professional community.

Solid and liquid samples of antiparasitic products were subjected to mass analysis ((MA)LDI-TOF, (matrix-assisted) laser desorption/ionization – time of flight) initially without the presence of organic matrix: pure, in combination with water and chloroform. In the second phase, the samples were subjected to mass analysis in combination with 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix. The solid sample was transferred into a solution of water, ethanol, hexane and diethylether. Afterwards all samples were sonicated for 10 minutes and then placed in a table centrifuge for 5 minutes.

The experimental part was aimed to create mass spectra and determine whether the mass spectrometry (MA)LDI-TOF is suitable method for the identification of selected insecticides.

KEYWORDS

insecticides, parasites, (MA)LDI-TOF MS, antiparasitic collars, spot-on products

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Současný stav řešené problematiky.....	8
2.1	Ektoparazité ohrožující psy a kočky.....	8
2.1.1	Blechy (<i>Ctenocephalides canis</i> , <i>Ctenocephalides felis</i>).....	9
2.1.2	Klíšťata (<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i>).....	10
2.1.3	Komárovití (<i>Culicidae</i>).....	11
2.1.4	Flebotomové rodu <i>Phlebotomus</i> a <i>Lutzomyia</i>	13
2.1.5	Veš psí (<i>Linognathus setosus</i>) a všenska psí (<i>Trichodectes canis</i>).....	14
2.1.6	Sametka podzimní (<i>Trombicula autumnalis</i>).....	14
2.1.7	Dravčík psí (<i>Cheyletiella yasguri</i>).....	15
2.1.8	Zákožka svrabová (<i>Sarcoptes canis</i>), svrabovka kočičí (<i>Notoedres cati</i>), strupovka ušní (<i>Otodectes cynotis</i>).....	15
2.1.9	Problematika rezistence.....	16
2.2	Insekticidy.....	18
2.2.1	Dělení insekticidů.....	26
2.2.2	Užití insekticidů v obojcích a spot-on přípravcích.....	28
2.2.3	Karbamátové insekticidy – propoxur.....	30
2.2.4	Regulátory růstu – (S)-methopren.....	33
2.2.5	Fenylpyrazoly (fiproyly) – fipronil.....	35
2.2.6	Pyrethroidy – permethrin, flumethrin.....	38
2.3	Analytické metody používané k identifikaci insekticidů.....	42
2.4	Hmotnostní spektrometrie.....	45
2.4.1	Historický vývoj.....	45
2.3.2	Základní koncept hmotnostní spektrometrie (MA)LDI-TOF.....	47
3	Experimentální část.....	50
3.1	Použité chemikálie a roztoky.....	50
3.2	Analyzované vzorky.....	50
3.3	Použité přístroje.....	51
3.4	Příprava vzorků.....	51
3.5	Analýza pomocí (MA)LDI-TOF MS.....	52
4	Výsledky a diskuze.....	54
4.1	Fipronil.....	54
4.2	Methopren.....	61
4.3	Permethrin.....	63
4.4	Propoxur.....	64
4.5	Flumethrin.....	67
5	Závěr.....	69
6	Seznam použitých informačních zdrojů.....	71
7	Seznam použitých zkratek.....	79

1 ÚVOD

Insekticidy jsou látky, které chemicky nebo biologicky regulují výskyt hmyzu (dezinfekce). Spadají pod skupinu pesticidů, které se dělí dále podle cílových organismů.

S hmyzem lze bojovat dvěma způsoby. Prvním z nich je jeho regulace například tím, že parazitům znemožní rozmnožování. Druhým způsobem je jeho odpuzování, čímž se hmyzu zabraňuje v destruktivním chování, které je pro člověka nežádoucí, a v případě potřeby je také možné zvolit přímé usmrcení. Látky, kterými se práce zabývá, lze souhrnně označit jako antiparazitika, a jsou veřejnosti běžně k dostání ve specializovaných chovatelských potřebách. Antiparazitické přípravky jsou nejlepším způsobem prevence proti napadení blechami, klíšťaty nebo komáry u domácích zvířat, koček a psů. Infestace domácích mazlíčků parazity a ochrana před nimi je běžnou praxí chovatelů domácích zvířat.

Každý antiparazitický přípravek obsahuje aktivní složky, které lze zařadit do chemických tříd nebo alespoň „kategorií“ s podobnými funkčními skupinami, což znamená, že sdílejí specifickou molekulární strukturu. Všechny insekticidy mají řadu obecných vlastností, které určují jejich možnosti využití. Aktivní složky nesoucí stejnou chemickou strukturu mají obvykle stejný mechanismus účinku, ale často jiné spektrum aktivity či toxicity jak pro parazity, tak pro hostitele. Insekticidy lze do kategorií dělit podle různých kritérií. Podle původu, podle místa působení, podle způsobu aplikace a podle mechanismu působení.

V experimentální části této bakalářské práce bylo cílem naměřit hmotnostní spektra a zjistit, zda je hmotnostní spektrometrie (MA)LDI-TOF ((matrix-assisted) laser desorption/ionization – time of flight) vhodnou metodou pro identifikaci vybraných insekticidů – tato metoda umožňuje rychlou analýzu velkého množství vzorků narozdíl od dnes používaných metod. Dalším cílem této práce bylo zjistit, jestli lze pomocí (MA)LDI-TOF MS identifikovat insekticidy v přípravcích s relativní molekulovou hmotností iontů menší než 520 Da, a to přímo – bez matrice, a porovnat hmotnostní spektra insekticidů naměřená s matricí a bez matrice (případně v různých rozpouštědlech).

Insekticidní přípravky byly pro experimentální část této práce vybrány podle jejich dostupnosti na trhu a také podle finanční dostupnosti.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 EKTOPARAZITÉ OHROŽUJÍCÍ PSY A KOČKY

Psi a kočky jsou v dnešní době běžně chováni jako právoplatní členové domácností, a s tím přichází i komplikace a rizika – jsou hostiteli nejen mnoha endoparazitů¹, ale i ektoparazitů. Běžně jsou ve společnosti těchto savců nacházeni členovci (*Arthropoda*) jako blechy, klíšťata nebo pakomáři. Ti bývají zpravidla druhově specifictí (není nutně podmínkou) a za konkrétních předpokladů může docházet k vzájemnému přenosu ze psa na kočku a opačně, a také k přenosu na člověka.

Parazitismus je typem vzájemného soužití, kdy jeden organismus (parazit) využívá druhý organismus (hostitele) jako zdroj potravy a dalších k přežití nutných potřeb. Parazité jsou až na specifické mikroparazity viditelní pouhým okem a na rozdíl od predátorů (případně parazitoidů) své hostitele nezabíjejí, jelikož žijí na hostiteli delší dobu. Parazité jsou menší než jejich hostitel a vykazují vysoký stupeň specializace – proto se rozmnožují rychleji. Konkrétní zastoupení daných druhů parazitů závisí na tom, jedná-li se o psa nebo kočku.

Vnější parazité se vyskytují zejména u jedinců, kteří mají možnost pohybu venku nebo žijí v bytě, ale přicházejí do styku s jedinci, kteří ven chodí (týká se především koček). Parazitární onemocnění se tak stávají významným problémem veterinární medicíny, protože mají vztah i ke zdraví člověka. Z toho důvodu je důležitá prevence, která předchází mnohdy komplikovanější a náročnější léčbě, jelikož při objevení choroby se už jen těžko dosahuje zamezení potenciálního šíření, především, mají-li majitelé více než jedno zvíře. Vnější parazité hostitele obtěžují, jelikož sají krev nebo tkáňový mok, což vede k podráždění kůže. Velmi často jsou rovněž přenašeči bakteriálních a virových infekcí jako je například lymská boreliosa, klíšťová encefalitida či babesiosa.

Vhodnou formou prevence je správné použití antiparazitik ve formě obojků (poskytují ochranu až po dobu 8 měsíců) nebo spot-on pipet, u kterých je třeba dbát na pravidelnost aplikace, protože zblešení, klíšťata aj. jsou celoroční problematikou s výjimkou krátkého období v zimě. Jako aktivní látky se využívají například selamectin, moxidectin, permethrin, amitraz nebo fipronil (oddíl 2.2).

V září roku 2011 byl zrealizován mezinárodní průzkum mezi 1500 chovateli psů (750) a koček (750) v rovnoměrném zastoupení z Německa, Francie, Itálie, Španělska

¹ Například škrkavky (*Toxocara canis*, *Toxocara cati*), tasemnice (*Dipilidium caninum*), vlasovec psí (*Dirofilaria immitis*) aj. Tito parazité však nejsou předmětem této práce.

a Velké Británie, kteří měli zkušenost s používáním spot-on přípravků. Výzkum přinesl alarmující zjištění o nedostatečné prevenci u domácích mazlíčků před nebezpečnými parazity. Bylo zjištěno, že 77 % chovatelů ošetřuje svá zvířata v průměru méně než třikrát ročně [1].

2.1.1 BLECHY (*CTENOCEPHALIDES CANIS*, *CTENOCEPHALIDES FELIS*)

Napadení blechami patří mezi nejčastější parazitosu na území České republiky a vrcholu dosahuje koncem léta. V zimě blechy obecně nejsou schopny přežívat, nicméně rozmnožování ve vytápěných prostorech je zcela běžné. V řiši hmyzu existuje přes 2200 druhů blech, ale u psů a koček nejčastěji nacházíme blechu psí (*Ctenocephalides canis*) (obr. 1) a blechu kočičí (*Ctenocephalides felis*) (obr. 2), přičemž blecha kočičí je běžnější (její výskyt je až 98 %), ale blecha psí přechází snadněji na člověka [2].



Obrázek 1: Blecha psí (zdroj: Förstl M.: Praktický atlas lékařské parazitologie)

Blecha je hnědožlutý druhotně bezkřídlý hmyz o velikosti 1–8 mm. Vývojový cyklus blech zajišťují samičky, které během 4–6 týdnů kladou mezi 30 až 50 vajíčky denně a ty pak se srstí vypadávají do okolí. V období deseti dnů se z vajíček vyvine štětinatá larva, která využívá jako zdroj potravy zbytky kůže a další organický odpad. Larva se třikrát svléká a v posledním stádiu se zakuklí, aby se po 5 až 9 dnech vylíhla dospělý jedinec. Ideální prostředí pro líhnuté blechy je zhruba 20–23 °C a vysoká vlhkost – při nepříznivých podmínkách jsou blechy schopny zůstat zakuklené i několik měsíců. Protože vylíhnutá blecha pohlavně dospívá hned následující den, trvá nejkratší vývojový cyklus 11 dnů u blechy kočičí a 18 dnů u blechy psí. Za příznivých podmínek jsou blechy schopné na hostiteli přežívat po dobu až tří měsíců, ale reálně se přežití pohybuje kolem 3–4 týdnů.



Obrázek 2: Blecha kočičí (zdroj: Förstl M.: Praktický atlas lékařské parazitologie)

Obě pohlaví blech sají krev a v místě kousnutí tak způsobují lokální zánět, který se projevuje alergií na bleší kousnutí (FAD – flea allergy dermatitis) a je asi nejběžnějším problémem. Alergie je způsobena hapteny, které jsou obsaženy ve slinách blech a spolu s kolagenem v kůži hostitele tvoří kompletní antigen, proti kterému se vyvíjí

hypersenzitivní reakce [3]. Hypersenzitivní reakce právě na tento antigen jsou u koček nejčastější, u psů se jedná o stejnou příčinu v 80 % případů [4], a vyvíjí se zpravidla mezi třetím a pátým rokem života. Další komplikací může pak být pyodermie (hotspot, akutní hnisavý zánět kůže) a zvýšený tok kožního mazu. Blechy jsou také vektorem pro různé viry, bakterie, ale i prvoky a hlísty: tasemnici psí (*Dipylidium caninum*), *Yersinia pestis* (mor), *Bartonella henselae*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Clostridium tetani*.

Prevence i terapie zahrnují především eliminaci dospělých blech a jednotlivých vývojových stádií (vajíčka, larvy, kukly) z hostitele i prostředí, ve kterém se vyskytují, protože dospělí jedinci jsou v populaci zastoupení jen kolem 5 %. Proto je třeba ošetřit všechna chovaná zvířata adulticidními přípravky v kombinaci s repelenty nebo regulátory hmyzu (spot-on) a pravidelně čistit místa určená k odpočinku i další bytové prostory suchou cestou, kotce a venkovní prostory pak za pomoci insekticidů a horké vody [5].

2.1.2 KLÍŠŤATA (*IXODES RICINUS*, *DERMACENTOR RETICULATUS*)

Napadení klíštětem (obr. 3) je na našem území druhou nejčastější ektoparazitou, která je vázána na sezónní období, avšak během posledních let výskyt klíšťat narůstá díky cestování, importu domácích zvířat a příznivým klimatickým podmínkám. V přírodě se klíšťata přirozeně vyskytují především v listnatých a smíšených lesích s křovinatým podrostem, na loukách a v mokřadech. Na území České republiky bývá nejintenzivnějším obdobím výskytu klíšťat období mezi březnem až červnem/červencem, a pak také v září a říjnu. Pro jižní Evropu je nutno počítat s výskytem klíšťat celoročně, naopak v severoevropských zemích se nejvíce vyskytují v červnu a září. Klíšťata bývají aktivní už při 7 °C a jejich aktivita klesá spolu se suchými letními měsíci. Nejvhodnějšími životními podmínkami pro klíště je teplota mezi 17–20 °C spolu s relativně vysokou vlhkostí vzduchu.



Obrázek 3: Klíště obecné (zdroj: Fiala M., biolib.cz)

Vývojový cyklus klíštěte se skládá ze čtyř vývojových fází, kdy vajíčko přechází v larvu (ta má na rozdíl od dalších stádií pouze šest nohou, nikoliv osm), dále nymfu až do dospělého jedince. Délka vývojového cyklu je závislá na konkrétním druhu klíštěte a momentálních vnějších podmínkách (2 až 6 let), avšak jedno stádium se zpravidla vyvíjí zhruba jeden rok. Všechna vývojová stadia pro svůj vývoj potřebují krev, kterou získávají od svých hostitelů. Larvy a nymfy nejčastěji parazitují na drobných hlodavcích, ještěrkách

a ptácích. Dospělé samičky se pak zaměřují především na lesní zvěř, domácí kopytníky, psy a kočky. Pro člověka jsou ohrožující všechna vývojová stádia [6].

Samotných druhů klíšťat je známo zhruba 850, ale mezi nejčastější druhy, které napadají psy a kočky patří klíště obecné (*Ixodes ricinus*) (obr. 3) a piják lužní (*Dermacentor reticulatus*; vyskytuje se pouze na Břeclavsku, jeho charakteristickým znakem jsou mramorovaná záda, a to že dává přednost vlhčímu prostředí) (obr. 4) [3]. Dále například klíště psí (*Rhipicephalus sanguineus*), které se na území České republiky přirozeně nevyskytuje, ale je k nám zanášeno jako následek cestování psů do Středomoří – odtud jsou pak i získávány psí nákazy.



Obrázek 4: Piják lužní (zdroj: skudci.cz)

Jak již bylo zmíněno, všechna vývojová stádia klíšťat sají krev a v místě kousnutí způsobují kvůli toxinům ve slinách lokální zánětlivou reakci, která při silném napadení (nebo u zvířecích mláďat) může způsobit klíšťovou paralýzu nebo úhyn zvířete. V případě, kdy pouze přetrvává lokální podráždění, se může zvířeti nasadit na kratší časový úsek například prednison [5].

Klíšťata však přenášejí závažné virové, bakteriální i parazitární choroby jako virová klíšťová meningoencefalitida, lymská boreliosa, rickettsiosa, ehrlichiosa, babesiosa, anaplazmosa, Q horečka, klíšťová paralýza a bartonelloza, které mohou být v některých případech nebezpečné i pro člověka a kontakt s domácím zvířetem zprostředkuje rozšíření nákazy. U řady nemocí se jedná o nákazy spojené s vycestováním do jižních destinací, ale často i blíže (babesiosa je již na jižní Moravě a na Slovensku) [5].

2.1.3 KOMÁROVITÍ (CULICIDAE)

Komárovití patří mezi čeled' dvoukřídlého hmyzu, jehož zástupci skýtají zhruba 3000 druhů (v České republice přes 40 druhů). U nás se vyskytují nejvíce komáři pisklaví (obr. 5) v lužních lesích, v okolí řek a vodních ploch. Mají štíhlé tělo, dlouhé nohy a v závislosti na druhu mají komáři různou velikost, ta nicméně nepřesáhne 16 mm a jejich hmotnost se pohybuje mezi 2–2,5 mg. Jejich charakteristickým znakem je dlouhý sosák uzpůsobený pro bodání a šupinky, které lze



Obrázek 5: Komár pisklavý (zdroj: Šimek T., biolib.cz)

vidět na těle i křídelních žilkách. Všichni komáři se živí nektarem, ale samičky komárů sají i krev teplokrevných živočichů (hematofágie), přičemž v častých případech dochází k přenosu nemocí. K přenosu dochází při sání krve, kdy samice sají krev a skrz bodavý sosák vpravují své sliny do rány, aby docházelo k ředění krve. Těmi lze během krátkého času přenášet viry, bakterie a jednobuněčné organismy. Jedním z onemocnění, která komáři přenášejí je *dirofilariosa* nebo také srdeční červivost (obr. 6). Jedná se o onemocnění způsobené vlasovkou psí (*Dirofilaria immitis*; mohou být ale zavlečeny i jiné druhy – například z Ameriky *Dirofilaria repens*, z Asie vlasovec medicínský *Dracunculus medinensis* či africká *Brugia patei*), které postihuje především psy, nicméně je v některých případech přenositelná i na člověka. Vlasovka parazituje v krevním oběhu zvířete a je velmi tenká a poměrně dlouhá. Jejich vývojový cyklus probíhá v organismu vedlejšího a hlavního hostitele. Vedlejším hostitelem, a tedy přenašečem, bývají právě komáři, případně další druhy bodavého hmyzu. Hlavním hostitelem jsou pak různí příslušníci živočišných druhů a slouží k vývoji v pohlavní fázi parazita. Samci mívají délku kolem 12–18 cm (šířka cca 1 mm) a samice 25–30 cm (šířka cca 1,3 mm). Vlasovky parazitují v dospělém stádiu zpravidla v pravé předsíni komory srdce, případně v plicním kmeni a tepnách, dále také v přední a zadní duté žíle zvířete.

Onemocnění je rozšířeno nejvíce v Africe, Asii, Austrálii, Severní i Jižní Americe a v současnosti již i v jižní Evropě a pomalu se šíří směrem do střední Evropy [7]. V našem regionu byly zaznamenány jednotlivé případy v oblastech na dolních tocích Dyje a Moravy. Léčba spočívá v naprosté eliminaci dospělých jedinců za pomoci přípravků obsahujících relativně toxické sloučeniny arsenu, a proto se vyskytují i značné nežádoucí účinky a je třeba zvíře na několik dní hospitalizovat; jako účinná látka se využívá thiacetarsamid sodný či dihydrochlorid melarsominu. V krajních případech je třeba přistoupit i k chirurgickému zákroku a mechanicky vlasovky odstranit.



Obrázek 6: Srdeční červ v srdci kočky
(zdroj: advocate-spot-on.com)

Jako prevenci je vhodné využívat přípravky hubící larvy (diethylkarbamazin, ivermektin, selamektin, milbemycin, moxidectin [7]), nebo vhodné repelentní přípravky a aniparazitické obojky proti bodavému hmyzu.

2.1.4 FLEBOTOMOVÉ RODU *PHLEBOTOMUS* A *LUTZOMYIA*

Kotule, nebo také pakomár, *Phlebotomus perniciosus* (obr. 7) patří do čeledi pakomárovitých, jejíž zástupci jsou velmi podobní komárům. Dospělí jedinci jsou zhruba 1,5–3,0 cm dlouzí a mají nažloutlou barvu, výrazné černé oči, vyklenutý hrudník nese vztyčená oválná křídla a mají ochlupené tělo i nohy. Samičky kladou vajíčka v dávkách do tmavých štěrbin či prasklin bohatých na organické látky. Vajíčka jsou malá, oválného tvaru a mají nahnědlou barvu. Typickým znakem pakomárů je dlouhý pár koncových štětín. Vyskytují se ve všech zemích Středomoří, Asii i Africe. Jejich sezónní výskyt je vázán především na období od května do září (v mírném podnebí až do října).

Pakomáři, ještě spolu s rodem *Lutzomyia*, jsou vektory pro prvoky rodu *Leishmania* (ničivky) patřící mezi třídy trypanozóm, které způsobují onemocnění zvané leishmanioza [8]. *L. infantum* a *L. tropica* se vyskytují především v jižní Evropě, Asii a Africe (pro *Phlebotomus*). *L. chagasi* a *L. peruviana* lze nalézt v oblasti Severní a Jižní Ameriky (pro *Lutzomyia*). Proto velkou roli v rozšiřování nemoci může hrát cestování a migrace lidské i zvířecí populace.



Obrázek 7: *Phlebotomus perniciosus*
(zdroj: Ray Wilson, diptera.info)

Například v Maroku je mj. také důležitý faktor v podobě zvyšující se urbanizace, kdy jsou vznikající osady obvykle přelidněné a neposkytují možnost pro dostatečnou sanaci [9].

V těle zvířete ničivky cizopasí ve svém nebičikátém stádiu a napadají monocyty a další buňky, které se spolupodílejí na funkci imunitního systému (buňky ve slezině, játrech atp.). Při rozmnožení zcela zaplní prostor, napadené buňky praskají a dochází tak k dalšímu rozšiřování nákazy uvnitř těla.

V oblastech, kde dochází ke konstantnímu výskytu leishmaniosy, vzdorují zvířata nákaze značně lépe než ta, která se do těchto míst dostanou z oblastí, kde není toto onemocnění běžné. Ovšem dostanou-li se psi pocházející z oblastí trvalého výskytu leishmaniosy např. do střední Evropy, objeví se u nich záhy příznaky onemocnění [8]. K léčbě onemocnění se využívají přípravky založené na bázi antimonu po dobu tří týdnů, které nicméně nezaručují úspěšné uzdravení. Neléčená leishmanioza vede vždy k uhynutí zvířete.

2.1.5 VEŠ PSÍ (*LINOGNATHUS SETOSUS*) A VŠENKA PSÍ (*TRICHODECTES CANIS*)

Veš psí je na rozdíl od blechy psí vzácnějším parazitem. Má shora dolů zploštělé tělo a o něco kratší končetiny, které nejsou přizpůsobeny ke skákání. Dospělí jedinci i larvy se živí krví svého hostitele. Jelikož nabodávají kůži zvířete, dochází k úpornému svědění podobnému jako při zblešení. Pes si pak postižená místa škrábe a kouše, a tím si způsobuje drobná i rozsáhlá poranění. Všenky krev sají jen zřídka, živí se především vrstvami pokožky a kožním mazem.

Celý životní cyklus vši i všenky se odehrává na těle hostitele, kdy oplozené samičky kladou do srsti zvířete vajíčka, která se přilepují na jednotlivé chlupy (hnidy) [3]. Ty mají ze začátku bílou barvu, a když dojde k vyklubání jedince, barva se změní. Kromě toho potřebují vši a všenky k životu vhodné prostředí – stálou teplotu těla, při které se larvy vylíhnou zhruba během jednoho měsíce. Tato vývojová stadia se nazývají nymfy do doby, než se přemění na pohlavně vyzrálého dospělého jedince.

Nejčastěji bývá napadena hlava, čenich, okolí pysků, uší a očí a na hrudi. Výhodou pro odvšivení psa (probíhá v zásadě stejně jako odblešení) je to, že na rozdíl od blech i všenek se vši moc nepohybují a spíše se drží na jednom místě.

2.1.6 SAMETKA PODZIMNÍ (*TROMBICULA AUTUMNALIS*)

Sametka (obr. 8) je druh roztoče, který parazituje na teplokrevných savcích i lidech. Na našem území se nejčastěji s parazitujícími larvami setkáváme v průběhu srpna a září. Ty mívají oranžovou až červenou barvu, tři páry nohou (nymfy čtyři páry).



Obrázek 8: Sametka podzimní (zdroj: abecedazahrady.dama.cz)

Dospělý jedinec dosahuje velikosti zhruba 1 mm a tělo mu hustě pokrývají chloupky. Larvy se živí kožními buňkami zvířat tak, že vstříknou na pokožku sekret slinných žláz, který obsahuje trávicí enzym, jehož následkem vznikají bolestivě otoky, které svědí.

Kousnutí sametkou vyvolává alergickou reakci, která se zhoršuje v teplém prostředí a sama mizí až po 10–14 dnech. Toto onemocnění se nazývá trombikulosa, a pokud nejde k léčení, může se stát, že se ranky mohou druhotně infikovat a způsobit hnisavá ložiska.

Léčba spočívá v aplikaci insekticidních preparátů (pyrethroidy) s cílem zahubit larvy a v případě sekundární infekce se podávají antibiotika. Navíc proti svědění je vhodné zvířeti podávat antihistaminika [3].

2.1.7 DRAVČÍK PSÍ (*CHEYLETIELLA YASGURI*)

Dravčík psí je dalším druhem roztoče, který parazituje na psech. Způsobuje nakažlivé a snadno se šířící onemocnění zvané cheyletielosa (dravčíkovitost). Daří se mu především v případě špatných hygienických podmínek s vyšší koncentrací zvířat, jako jsou např. obchody se zvířaty (štěňata a koťata), zvířecí útulky atp. Žlutobílé tělo o rozměru 0,2–0,6 mm mají řídce pokryté chlupy se čtyřmi páry končetin. Hlavová část dravčíka má vyvinutá tenká zatažitelná klepítka. Dospělí jedinci se poměrně rychle pohybují a díky svému vzhledu proto získali lidový název „pochodující lupy“ [3]. Zvýšená tvorba lupů však nemusí znamenat, že se jedná o dravčíka. Potvrdit onemocnění není nijak složité, dravčíka lze snadno vidět pod mikroskopem.

Dravčíci sají tkáňový mok a celý vývojový cyklus probíhá na psovi. Všechna samčí vývojová stadia mimo psa hynou do 48 hodin (samičky přežívají až deset dnů). Samičky podobně jako vši lepí svá vajíčka na chlupy zvířete, která nicméně nedrží tak pevně. Při napadení zvířete dochází k tvorbě kožních šupin na krku i zádech, což lze nejlépe pozorovat u mláďat mezi 2–8 týdny věku. Při rozhrnutí srsti je tedy možné pozorovat lupy, lehké překrvení a podráždění kůže. V některých případech může docházet ke zvýšenému mazotoku. U koček dochází k menšímu výskytu lupů, jelikož jejich srst podléhá poměrně pravidelnému samočištění.

K léčbě se používají koupele nebo postřik sprejem s akaricidními přípravky (pyretriny, amitraz, fipronil). Ošetřování se opakuje v třítydenních intervalech.

2.1.8 ZÁKOŽKA SVRABOVÁ (*SARCOPTES CANIS*), SVRABOVKA KOČIČÍ (*NOTOEDRES CATI*), STRUPOVKA UŠNÍ (*OTODECTES CYNOTIS*)

Zákožka svrabová je původcem sarkoptového svrabu, který je velmi nakažlivým kožním onemocněním postihujícím především psy (může však napadnout i kočky a lidi). Parazit je veliký zhruba 0,2–0,3 mm a má okrouhlý tvar. Oplodněné samičky se zavrtávají do kůže a vytváří chodbičky, které se denně prodlužují zhruba o 3 mm. Do chodbiček kladou vajíčka a zanechávají za sebou trus, což vede k rozšíření pokožky a intenzivnímu svědění. Zvíře se pak škrábe, vytváří si oděrky až do krve, traumatizuje ještě více postižená místa a vytváří tak možnosti pro zasažení sekundární infekcí. Zákožky se nejčastěji vyskytují na řídce osrstěných místech – v okolí loketního kloubu, ušního boltce atp. Zvířata se musí nejdříve ostříhat a je třeba je opakovaně koupat v antiseboroidickém šamponu, odstranit krusty z kůže a následně vykoupat v akaricidním prostředku. Kromě

lokální terapie je třeba podávat ivermektin. Ten však nelze podávat např. u kolíí a bobtailů, jelikož u nich působí neurotoxicky [3]. Proti svědění se podává prednison.

Svrabovka kočičí je původcem notoedrového svrabu a kromě koček může napadat i psy, králíky a myšovitě hlodavce. Svrabovka je velmi podobná zákožce, nicméně je o něco menší (0,15–0,18 mm). Symptomy jsou prakticky stejné jako u sarkoptového svrabu a první změny u koček bývají nejčastěji na čele, hřbetu nosu a ušních boltcích. Srst řídne a kočky si jejím čištěním pomáhají rozšiřovat zamoření po těle. Dochází i ke změnám v okolí očí a kočky poté špatně vidí. Vzhledem k tomu, že některé akaricidy mají u koček vyšší toxicitu, musí se k léčbě používat pouze ivermektin [1].

Původcem otodetkového svrabu je strupovka ušní velikosti 0,3–0,5 mm, kterou lze nalézt především u koček. Žije na povrchu kůže, kde se živí tkáňovým mokem, a svým působením v zevním zvukovodu způsobuje záněty za doprovodu úporného svědění. Zvukovody bývají naplněny hnědým mazem, ucho je bolestivé a škrábáním si zvíře může způsobit výron krve do podkoží ušního boltce. Zvukovody je tedy nutné nejdříve vyčistit a následně vykapat a protřít ucho účinnou látkou (amitrazem, ivermektinem a jinými insekticidy).

2.1.9 PROBLEMATIKA REZISTENCE

Vládní dokument Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) – Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants [10] – definuje rezistenci na antiparazitní látky jako „významný nárůst počtu jedinců v rámci jedné populace druhu parazitů, které mohou tolerovat dávky účinných látek, které se ukázaly být letální pro většinu jedinců stejného druhu“. Tato rezistence je obvykle dědičná a přenáší se tedy na potomstvo.

Z praktického hlediska to pro výrobce i zemědělce či chovatele znamená, že produkt, který v minulosti poskytoval spolehlivou kontrolu nad parazity, již není schopný populaci parazitů zredukovat ani při zvýšení dávky. Ve většině případů se jedná o rezistenci vůči aktivním látkám, které byly na pozemku či domácím mazlíčkovi používány dlouhá léta. Přesto se může vyskytnout rezistence i vůči látkám, které použity nikdy nebyly, jelikož se bude jednat o látky stejné chemické skupiny a došlo k tzv. křížové rezistenci (oddíl 2.2).

Zatím byla rezistence zaznamenána u více než 500 členovců (much, vší, blech, klíšťat, roztočů) a hlístů (škrkavek, motolic), které mají nepříznivý vliv na úrodu, dobytek, domácí zvířata či lidi. Je však vhodné vědět, že různá vývojová stádia parazitů mají různou sílu rezistence, což může usnadnit boj s rezistentními populacemi [11].

2.2 INSEKTICIDY

Insekticidy jsou látky, které chemicky nebo biologicky regulují výskyt hmyzu (dezinsekce). Patří pod skupinu pesticidů, které se dělí dále podle cílových organismů. Nicméně některé insekticidní účinné látky se mohou využívat i jako akaricidy (látky určené k hubení roztočů), například permethrin [12]. Existují možnosti, jak bojovat s hmyzem buď prostřednictvím jeho regulace, nebo přímo jeho vyhubením. Látky, kterými se tato práce zabývá lze souhrnně označit jako antiparazitika.

Problematika determinace, kategorizace a právního vymezení antiparazitik je globálně diskutovaným tématem. Označení „pesticid“ je běžně používaný výraz pro chemické látky určené k regulaci a hubení škůdců plodin – hmyzu, roztočů aj. Problémem je, že většina veterinárních parazitů jsou také hmyz, roztoči atd., a tak mohou výrobky používané proti takovýmto veterinárním ektoparazitům obsahovat stejné účinné látky jako ty, které se používají proti škůdcům plodin (tj. pesticidy). Kvůli tomu mnoho let byla (a v zásadě stále jsou) veterinární antiparazitika za pesticidy považována. V kontrastu s tím existuje pojem „léčivo“, což je termín, který se běžně užívá pro chemické látky používané k léčbě chorob především u lidí, ale i u zvířat. Z toho vyplývá nejednoznačnost, zda jsou veterinární antiparazitika pesticidy či léčivé přípravky. Dalším z důvodů, který dává prostor k diskuzi je fakt, že některé infekce v důsledku napadení ektoparazity jsou považovány za nemoci místo za parazitosy. Zvíře napadené vší má pedikulosu, při napadení roztoči se jedná o akarusu a napadený přežvýkavec střečky trpí hypodermatosou. Což nás opět staví k dilematu, zda jsou použité přípravky pesticidy či léčiva. Vzhledem k tomu, že národní předpisy na toto téma jsou často rozdílné, stejný výrobek od stejného výrobce může být v některých zemích pesticidem a v jiných zemích veterinárním přípravkem. Takovým typickým příkladem je ivermektin, který se používá jako pesticid v oblasti ochrany plodin, jako antiparazitikum v rámci humánní medicíny a jako veterinární přípravek proti vnějším i vnitřním parazitům. Je ivermektin pesticid? Pokud bychom se zeptali výrobců pesticidů na plodiny, nemohou říci ne. Zeptáme-li se ale výrobců veterinárních nebo humánních léčivých přípravků, nebudou chtít říci ano.

V České republice na základě platné právní úpravy se rozhodně nejedná o léčivé přípravky. Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech říká, že léčivými přípravky jsou látky nebo kombinace látek s léčebnými nebo preventivními vlastnostmi, nebo látky které lze podat za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění fyziologických funkcí, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy (veterinární léčivé přípravky určené pro použití u zvířat nebo

podání zvířatům: medikovaná krmiva, veterinární autogenní vakcíny) [13]. Tento zákon proto ukládá zařazení takových produktů na seznam vyhrazených veterinárních léčiv, který může zajišťovat pouze odborně vyškolená osoba s osvědčením. Jedná se tedy buď o veterinární přípravky (zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči), biocidy (zákon č. 120/2002 Sb., o biocidech – přípravky pro regulaci škůdců) nebo doplňkové látky (zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech: kokcidistatika a histomonostatika uvedená ve vyhlášce 356/2008 Sb., kterou se provádí zákon o krmivech).

Linie lidského rodu na Zemi existuje něco přes tři miliony let, ale hmyz je na světě již přes 250 miliónů let. Tudíž bylo naprosto nevyhnutelné, že se lidé budou pokoušet eliminovat vliv hmyzu, ať už na člověka samotného, tak i na jeho úrodu, domácí zvířata atp. Kolem 10 000 druhů hmyzu, z více než 1 milionu, se živí úrodou a z nich zhruba 700 způsobuje celosvětově největší škodu na lidmi vypěstovaných plodinách, a to jak na polích, tak i ve skladech. Můžeme předpokládat, že jeden z prvních způsobů ochrany před kousajícím létajícím hmyzem, který si naši primitivní předci osvojili, bylo držet se poblíž kouřících ohňů. Případně si roztírali bláto a prach na kůži, což je způsob, který lze pozorovat u slonů, divokých prasat nebo buvolů. Z pohledu dnešní moderní vědy se tak jednalo o repelenty, které jsou konkrétní kategorií insekticidů. Historikům se podařilo dohledat používání pesticidů až do dob Homéra [14] kolem 1000 let př. n. l. Ještě starší záznamy o insekticidech se vztahují ke spalování síry využívané jako fumigantu (aplikování ve formě par nebo plynů) [14]. Za snad vůbec nejstarší záznamy o využívání insekticidů lze považovat zmínku v nejvýznamnější přírodovědné encyklopedii starého Říma *Historia naturalis*, kterou napsal římský válečník a filosof Plinius Starší. Jednalo se o používání žluči z ještěrky zelené na ochranu jablek před červi a hnilobou [14]. Lze ale také najít zmínky o celé řadě používaných látek, např. výtažcích z pepře a tabáku, mýdlové vodě, vápnu, octě, terpentýnu, rybím tuku, solném roztoku nebo třeba louhu, nicméně efektivnost jejich účinnosti je diskutabilní [15].

Jelikož během druhé světové války (1940) byl poměrně úzký profil výběru insekticidů (látky s arsenem, ropné oleje, nikotin, pyrethriny, rotenon, síra a kyanovodík), došlo právě díky tomuto faktu k propuknutí nové chemické éry, rozvoji konceptu chemické kontroly nad hmyzem a k výrobě insekticidů v masovém měřítku. Začaly vznikat syntetické organické insekticidy, přičemž prvním takovým bylo celosvětově nechvalně známé DDT (dichlordifenyltrichlorethan) [16].

Všechny výrobky určené pro boj s parazity se skládají z jedné či více aktivních látek, které mají proti parazitům specifickou účinnost, spolu s neaktivními či inertními složkami jako jsou rozpouštědla (voda, alkoholy), stabilizátory (zabraňují chemickým reakcím mezi přísadami), disperzanty (udržují suspenzi a brání usazování), konzervanty (zabraňují růstu nežádoucích mikroorganismů) či emulgačními látkami. Proto ne všechny složky, jež se v přípravcích vyskytují, mají pouze pasivní úlohu, ale mohou mít hned několik funkcí, které mají vliv na účinnost, bezpečnost a kvalitu. Mohou však také ovlivňovat to, zda výsledný produkt dráždí oči, kůže, je hořlavý, výbušný či žíravý.

Všechny tyto součásti dohromady tvoří konkrétní přípravek, u kterého nezáleží pouze na složení, ale také na způsobu, jak se jednotlivé přísady přidávají během výrobního procesu (dalo by se říci, že každý výrobce si drží svou „recepturu“). Jednotlivé přípravky obsahují i směsi různých účinných látek, jejichž poměry se značně liší v procentuálním zastoupení v závislosti na aplikaci (rozsahy se pohybují kolem 1 % či méně např. pro injekce a kolem 50 % či více např. pro tekuté přípravky [17]).

S vyvíjením vlastních receptur částečně souvisí problematika generických léků. Ačkoliv představují pozitivní možnost a příležitost, protože vytvářejí konkurenci, snižují ceny (a to i z původního výrobku) a zvyšují dostupnost, jsou zároveň i určitou hrozbou, jež se týká samozřejmě i insekticidních přípravků (typickým příkladem jsou obojky a spot-on přípravky obsahující fipronil, který byl inovativním preparátem značky Frontline). Určitá hrozba však spočívá v otázce odolnosti parazitů vůči generiku a v jeho kvalitě, která se může snižovat společně se zvyšujícím se počtem výrobců a distributorů.

U insekticidů je možné obecně sledovat několik základních vlastností. První z nich je spektrum účinnosti, které se vztahuje k počtu druhů parazitů, proti kterým je přípravek či jeho aktivní látky účinné. Některé výrobky mají široké spektrum účinnosti, což znamená, že regulují např. mouchy, klíšťata, roztoče i blechy zároveň. To souvisí i s důležitým faktem co do výhodnosti insekticidu – čím širší spektrum účinnosti má, tím více škůdců lze kontrolovat, a tím je pohodlnější pro využití v praxi (jak pro chovatele, tak pro výrobce). Vývoj a objevování nových insekticidů je proto atraktivní jak pro veřejné, tak i soukromé výzkumné laboratoře zabývajícími se oblastmi kontroly parazitů. Nicméně je v současnosti čím dál těžší objevit nějaké nové látky – od zavedení ivermektinu firmou Merck v roce 1980 [18] trvalo zhruba 25 let najít jinou účinnou látku proti hlísticím s jiným mechanismem účinku. Zmíněný mechanismus účinku je atribut, který se obvykle vztahuje

k mechanismům na buněčné či molekulární úrovni, které vedou k usmrcení parazita. Účinné látky stejné chemické třídy (např. organofosfáty a benzimidazoly) mají logicky proti parazitům stejný mechanismus účinku. Na mechanismy je nutno hledět z různých úhlů pohledu, neb je nezbytné znát způsoby, jak fungují, protože některé aktivní látky působící na molekulárních a buněčných úrovních mají vliv nejen na parazity, ale také na ostatní zvířata a někdy i savce (včetně člověka) a mohou tak být toxické, což vede k nutnosti nakládat s insekticidy obezřetným způsobem. Produkty s širokým spektrem účinku mohou představovat také vážnou hrozbu pro životní prostředí – například znečištění vodních zdrojů může zahubit značné množství hmyzu, ryb a dalších vodních živočichů, což může vést k narušení lokálního ekosystému.

Další vlastností, jíž je třeba věnovat pozornost, je rezistence parazitů vůči účinným látkám, jelikož celé populace parazitů se mohou stát imunní ve chvíli, kdy parazit najde způsob, jak obejít či překonat způsob působení látky. Parazit se pak stává rezistentní na všechny přípravky se stejným mechanismem účinku (tzv. křížová rezistence [19]), což značně zneprůjemňuje možnosti ochrany domácích a chovných zvířat. Jakou má insekticid úspěšnost, nám říká tzv. terapeutická účinnost, která udává, kolik parazitů bude zneškodněno během už probíhající nákazy. Obvykle se udává v procentech: pokud je např. uvedena terapeutická účinnost 95 %, znamená to, že bude v průměru usmrceno 95 % populace parazitů po použití přípravku dle příbalové informace. V běžné praxi je třeba, aby nově schvalovaný přípravek měl experimentálně ověřeno, že je jeho účinnost alespoň 80 %, aby mohl být schválen k uvedení na trh. V některých zemích v konkrétních případech je nutnost dosažení i 100 % (např. pro roztoče parazitujících na ovcích) [11]. Terapeutická účinnost je také závislá na formě doručení aktivní látky. Například injekce ivermektinu pro dobytek v klasickém dávkování 200 µg/kg je účinná proti škrkavkám, ale nepůsobí na roztoče a vši. Pokud se však k aplikaci použije pour-on metoda (roztok je určený k nalévání na hřbet podél celé páteře) v dávce 500 µg/kg, je účinná proti škrkavkám, roztočům, některým druhům vší, klíšťatům a muškám [11]. V rámci léčebných účinků se proto také zabýváme důležitou vlastností antiparazitik, a to je tzv. „knock-down“ efekt, což je výraz pro rychlost zabíjení – existují přípravky, které při aplikaci na psa zabijí 95 % blech již během prvních dvou hodin. Přípravky používané na hubení vší, klíšťat aj. (především pro domácí mazlíčky) mají typicky látky, které zabíjejí pomalu („killing softly“) a potřebují tedy ke snížení populace týdny.

V rámci prevence a ochrany před nežádoucími účinky je důležité sledovat, jaký má daný přípravek (aktivní látka) profylaktický účinek. Jak bylo řečeno, mnoho antiparazitik usmrcuje škůdce během prvních hodin, ale také poskytuje určitý stupeň ochrany, který zabraňuje opětovné infestaci. Pro výrobce je samozřejmě žádoucí, aby produkovali přípravky s co nejdelším reziduálním účinkem, ten však závisí na různých faktorech, jako je rozpustnost ve vodě (odolnost vůči dešti atp.), těkavost, odolnost vůči slunečnímu světlu (rozklad) či metabolismus hostitelských organismů, které mohou výrobky rychle metabolizovat.

Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovila klasifikaci pesticidů podle jejich nebezpečnosti, a to na základě jejich předpokládané akutní toxicity pro člověka [20], která je založena na nejnovější GHS OSN směrnici (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek) a odkazuje na technické stupně účinných látek používaných v pesticidech. Existují i jiné klasifikace nebezpečnosti pesticidů, které se však příliš neliší, např. z US EPA (Environmental protection agency) nebo z EU. Vzhledem k tomu, že pesticidy nejsou přímo testovány na lidech, je klasifikace založena na studiích toxicity provedených na laboratorních zvířatech, většinou hlodavcích, ale i dalších savcích. Klasifikace tříd nebezpečnosti na základě ústní nebo dermální LD₅₀ dle poslední verze doporučení (2009) je následující:

- Třída Ia: extrémně nebezpečné: < 5 mg/kg ústní, < 50 mg/kg kožní (na etiketě musejí mít označení „toxický“ či „jed“),
- Třída Ib: vysoce nebezpečné: 5–50 mg/kg ústní, 50–200 mg/kg kožní (na etiketě musejí mít označení „toxický“ či „jed“),
- Třída II: mírně nebezpečné: 50–2000 mg/kg ústní, 200–2000 mg/kg kožní,
- Třída III: lehce nebezpečné: > 2000 mg/kg ústní, > 2000 mg/kg kožní,
- Třída U: pravděpodobně nepředstavují akutní nebezpečí > 5000 mg/kg.

Ve většině klasifikací nebezpečnosti chybí třída „neškodný“, což vyplývá z logiky věci, že všechny pesticidy (antiparazitika) jsou určena k tomu, aby cílený organismus zahubila. Některé pesticidy však nejsou víc toxické než například běžná kuchyňská sůl či alkoholické nápoje.

Klasifikace WHO (i další) je založena na akutním nebezpečí otravy po jednorázové, obvykle náhodné, expozici. Nedává nám tak ale žádnou informaci o subletální dávce,

respektive o nežádoucích účincích po opakovaném vystavení nízkým dávkám. Je také důležité zmínit, že se klasifikace zpravidla týká látek, které jsou tzv. technicky čisté, což obvykle znamená čistotu ≥ 95 %. Mohou být ale i farmaceuticky (≥ 98 %) či analyticky ($\geq 99,9$ %) čisté. V souvislosti s bezpečností je množství nečistot velmi důležité, protože nečistoty mohou být toxické, dokonce i toxičtější než aktivní složka. Požadovaný stupeň čistoty pro výrobu veterinárních produktů závisí na předpisech pro jednotlivé země. V některých zemích je zapotřebí farmaceutické kvality u všech veterinárních přípravků, v jiných je technický stupeň přijatelný. Tyto rozdíly pak mohou mít významný dopad na kvalitu a bezpečnost prodáváných produktů.

Vzhledem k riziku s nakládáním s insekticidními látkami je třeba také sledovat bezpečnostní index (BI), což je poměr mezi jednotlivými dávkami aktivní látky, které nemají nežádoucí účinky na hostitele a doporučené terapeutické látky. Pokud je například doporučená terapeutická dávka $10 \mu\text{g/kg}$ a nejvyšší možná dávka bez nežádoucích účinků je $50 \mu\text{g/kg}$, pak bude bezpečnostní index 5. Z praktického hlediska to tedy znamená, že pokud dojde k podání terapeutické dávky např. dvakrát (záměrně či chybou), nebude zvíře nijak vážně ohroženo. Ve vyspělých zemích musí být tolerance vůči finálnímu přípravku určena pro jednotlivé cílové druhy zvířat (psy, kočky, dobytek aj.), a proto je teoreticky známá maximální dávka bez vedlejších účinků pro každý schválený druh. Co však zcela ošetřit nelze jsou proměnné jako typ plemene, věková kategorie a další podmínky (těhotné samice), a proto vždy existuje nebezpečí, že konkrétní zvířata budou více citlivá vůči přípravku, než je jejich bezpečnostní index. Z toho lze vyvodit, že čím je vyšší bezpečnost, tím jsou nižší rizika v podobě nežádoucích účinků. U dnešních veterinárních přípravků se bezpečnostní index pohybuje zpravidla mezi 3 až 10, nicméně u starších antiparazitik, od kterých se dnes spíše upouští, jako jsou chlororganické sloučeniny a organofosfáty, byl bezpečnostní index pouze 2 a dávkování muselo být proto velmi pečlivé [11].

Dalším bezpečnostním parametrem je terapeutický index² (TI), kdy se jedná o poměr mezi jedinou dávkou (která má terapeutický efekt – efektivní dávka ED_{50}) dělenou LD_{50} (rovnice 1).

$$TI = \frac{ED_{50}}{LD_{50}} \quad [1]$$

² Letální dávka (koeficient): výpočet dávky, která způsobí akutní uhynutí 50 % experimentálních zvířat. Pro veterinární účely se využívají pouze hlodavci (potkani, myši) a výjimečně psi. Terapeutický index se rozhodně neurčuje pro ovce či další skot, a tak je většinou nemožné určit specifický TI; využívá se tak pouze nespolehlivé určení LD_{50} pro hlodavce.

V závislosti na klasifikaci nebezpečnosti v některých zemích dochází k tomu, že účinné léčivé látky v různých veterinárních přípravcích lze jednoznačně považovat za pesticidy (například amitraz, organofosfáty, syntetické pyrethroidy, fipronil, imidacloprid atd.), jelikož jsou klasifikovány jako nebezpečné, a výrobci musí uvádět odpovídající upozornění na etiketách výrobků. Naopak jiné aktivní složky nejsou považovány za pesticidy, ale za veterinární léčiva, a jsou tak „ignorovány“ klasifikací nebezpečnosti (např. většina benzimidazolů, makrocyclické laktony atd.), a nemusí tak uvádět na etiketě daná upozornění, ačkoliv některé z nich jsou výrazně toxičtější než mnoho pesticidů [11].

Ke každé účinné látce či přípravku náleží bezpečnostní list (MSDS – material safety data sheet), což je dokument obsahující informace o možných rizicích (otravě, explozi), bezpečnostních opatření při manipulaci během výroby, dopravy a skladování, první pomoci atd. Bezpečnostní listy jsou tedy vydávány i pro veterinární antiparazitika, ale jsou používány pouze pro přepravu a skladování v průmyslových množstvích, nikoliv pro další prodej spotřebitelům. Co naopak neobsahují, jsou bezpečnostní pokyny pro použití na domácí zvířata, které jsou obvykle součástí etikety výrobku a musí být schváleny vnitrostátními veterinárními orgány. Obecně lze získat informace z databází bezpečnostních souhrnů konkrétních institucí: Parazitologického institutu na univerzitě v Curychu (CliniPharm a CliniTox), amerického Národního informačního centra o pesticidech, evropské agentury pro léčivé přípravky, webové stránky Exttoxnet (společná iniciativa několika univerzit v USA, <http://exttoxnet.orst.edu/>) a webové stránky IPCS INCHEM (Informace o chemické bezpečnosti z mezivládních organizací, <http://www.inchem.org/>). Množství a kvalita bezpečnostních údajů o antiparazitických se velmi liší. Důvodem je to, že byly provedeny mnohé studie s použitím různých vlastností účinných látek a s různými postupy. Pro spolehlivé informace jsou však k dispozici informace ve vládních místech registračních úřadů (např. SÚKL – Státního ústavu pro kontrolu léčiv).

Při pojmenovávání účinných látek se většinou používá jejich „běžný technický název“ (např. ivermektin), což bývá název používaný v rámci průmyslového využití nebo přímo obchodní název (Mectizan, Ivomec a Heartgard-30). Je však namístě podotknout, že každá látka má i své chemické pojmenování (zpravidla systematické), které se samo o sobě mění dle patřičného mezinárodního orgánu. U nás je nejvíce rozšířené názvosloví dle UIPAC, ale je také možnost pojmenovávat či užívat registrační číslo dle CAS registru [21].

Způsobů, jak aplikovat insekticidy je mnoho a nejlepší způsob použití či podání zvířeti má významný vliv na jeho účinnost. Každý způsob má samozřejmě svoje výhody a nevýhody, a proto je vhodné vždy zvažovat vyhovující alternativu. Obecně je možné říci, že přípravky lze aplikovat buď přímo na zvíře či do jeho okolí (ať již se jedná o psy, kočky, dobytek aj.). Při použití mimo zvíře se nejčastěji jedná o návnady obsahující insekticidy, pasti a úpravy povrchů, rybníků, či hnojiva. Tento způsob se nejčastěji využívá proti různým druhům much a komárů. Využití aplikace na zvířeti nabízí mnohem širší možnosti: obojky a spot-on přípravky (pouze u domácích mazlíčků), máčení (skot, ovce, kozy apod.), insekticidní prach a prachové koupele (drůbež, prasata a skot), impregnovaná drbadla, ušní značky napuštěné insekticidy (pouze u skotu), pour-on přípravky (aplikace podél páteře; skot a prasata), postřik. Následují také šampony, mýdla, spreje, prášky, krémy apod. (především domácí mazlíčci). Další možností je vnitřní užití – buď perorálně či parenterálně. Nejběžněji se využívá přidávání přípravků do pitné vody (prasata, drůbež, občas skot; domácí mazlíčci málokdy), injekcí (především dobytek), tekutých zálivek, tablet (domácí zvířata a drůbež) a léčiva s postupným uvolňováním (skot).

Výběr vhodného způsobu aplikace antiparazitik nezávisí na tom, zdali se jedná o ektoparazity či endoparazity. Přesto ne všechny účinné látky lze podat všemi způsoby, proto například odčervovací prostředky mají nejčastější formu tablet. Vše se ale také samozřejmě odvíjí od toho, jaká je konkrétní distribuce léčiva v dané zemi.

Je však na místě podotknout, že tato práce se zabývá konkrétními veterinárními insekticidy, jež se primárně orientují na ektoparazity, což znamená, že vhodné a nejvíce využívané budou jen určité chemické skupiny. Obecně lze konstatovat, že insekticidy využívané v psích obojcích a spot-on přípravcích jsou z hlediska účinné složky odvozené ze syntetických organických molekul dělicích se především do následujících skupin: chlororganické insekticidy, organofosfáty, karbamáty, amidiny, syntetické pyrethroidy, analogy juvenilních hormonů, neonikotinoidy, pyrazoly nebo spinosyny. Bez chemických skupin jsou to např. cryomazin, dicyklanil a metaflumizon [22]. Vhodné je také zmínit kategorizaci na repelenty a synergistické přípravky. Repelenty nezabíjí parazity, ale drží je dále od zvířete a synergistické přípravky zdokonalují parazitocidní účinky určitých aktivních látek nebo pomáhají překonat odolnost parazitů. Na boj s endoparazity se pak využívají benzimidazoly, imidazothiazoly, tetrahydropyrimidiny, isoquinoliny a salicylanilidy [22]. Bez chemických tříd se jedná o klorsulon, monepantel, nitroscanát,

nitroxinil a deriváty piperazinu [22]. Existují také insekticidy, jež mají účinek proti vnitřním i vnějším parazitům a nazývají se endektocidy, což jsou makrocyclické laktony [22]. Jak bylo řečeno, všechny zmíněné skupiny patří k látkám, jež se vyrábí synteticky v laboratořích, ale existují také insekticidy přírodní – ať již získané z živočichů či minerálního nebo rostlinného původu.

2.2.1 DĚLENÍ INSEKTICIDŮ

Aktivní složky insekticidních přípravků lze shrnout do chemických tříd nebo alespoň „kategorií“ s podobnými funkčními skupinami, což znamená, že sdílejí specifickou molekulární strukturu – například všechny organofosfáty jsou deriváty kyseliny fosforečné. Všechny insekticidy mají tedy řadu obecných vlastností, které určují jejich vhodnost pro užití na boj s parazity u hospodářských i domácích zvířat. Aktivní složky nesoucí stejnou chemickou strukturu mají obvykle stejný mechanismus účinku; co se ale u účinných látek o stejné chemické skupině často liší je spektrum aktivity, toxicita jak pro parazity, tak pro hostitele, vliv na životní prostředí atd.

Insekticidy lze dělit do kategorií podle různých kritérií. Podle původu (přírodní, syntetické, biopreparáty), podle místa působení (kontaktní – na povrchu škůdce, systémové – pronikají do organismu), podle způsobu aplikace (postřiky, fumiganty, poprašky, nástrahy, nátěry a impregnace) a podle mechanismu působení (převážně jako analogy a inhibitory enzymů) [24].

Posledním a nejběžnějším způsobem dělení je dělení z chemického hlediska, které se snaží vytvářet systém založený na kategorizaci především dle funkčních skupin či na odvození od mateřské sloučeniny. Práce se orientuje tímto způsobem a v následujících oddílech (2.2.3–2.2.6) se pak převážně drží schématu dělení dle Wharea a Whitacrea [14] a také Junquery [11]. Tato schémata se dotýkají hlavních tříd a technologií, ať už známých několik dekad, tak i skupin patřících mezi novější objevy.

Proti ektoparazitům se používají následující chemické třídy insekticidů (chronologicky seřazené dle dekády objevu):

- Chlororganické insekticidy (1940): širokospektrální insekticidy a akaricidy, dnes zakázány ve většině zemí, např. DDT, dieldrin, lindan.
- Organofosfáty (1950): širokospektrální insekticidy a akaricidy, postupně se v některých zemích přestávají používat, např. azametifos, chlorfenvinpos,

chlorpyrifos, kumafos, diazinon, dichlorvos, ethion, fenitrothion, fenthion, malathion, fosmet, foxim, trichlorfon.

- Karbamáty (1950) (oddíl 2.2.3): širokospektrální insekticidy a akaricidy, postupně se v některých zemích přestávají používat, např. karabryl, methomyl, propoxur.
- Amidiny (1960): především proti klíšťatům a jako akaricidy, např. amitraz, cymiazol.
- Syntetické pyrethroidy (1970) (oddíl 2.2.6): širokospektrální insekticidy a akaricidy, např. cyfluthrin, cyhalothrin, cypermethrin, cfenothrin, deltamethrin, etofenprox, fenvalerát, flumethrin, permethrin, fenothrin, tetramethrin.
- Regulátory růstu, IGR (1970) (oddíl 2.2.4):
 - zasahují do syntézy chitinu (CSI) – většina patří do skupiny benzoylfenylureátů (BPU), např. diflubenzuron, fluazuron, lufenuron, triflumuron;
 - analogy juvenilních hormonů (JHA), např. methopren, pyriproxyfen;
 - mezi IGR řadíme také dva specifické insekticidy nepatřící do CSI či JHA: cryomazin (triaziny) a dicyklanil (pyrimidinový derivát).
- Neonikotinoidy (1990): širokospektrální insekticidy a akaricidy, např. dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiamethoxam.
- Fenylpyrazoly (1990) (oddíl 2.2.5): širokospektrální insekticidy a akaricidy, např. fipronil, pyriprol.
- Spinosyny (1990): širokospektrální insekticidy a akaricidy, částečně systémové, např. spinosad, spinetoram.
- Isoxazolinyl (2010): širokospektré systémové insekticidy a akaricidy, např. afoxolaner, fluralaner, sarolaner (ve vývoji).
- Další nepatří do těchto chemických tříd: cyromazin, dicyklanil, metaflumizon.

Proti endoparazitům se používají tyto chemické třídy insekticidů (chronologicky seřazené dle dekády objevu):

- Benzimidazoly (1960): širokospektrá anthelmintika, např. albendazol, febantel, fenbendazol, flubendazol, mebendazol, netobimin, oxfendazol, oxibendazol, rikobendazol, thiabendazol, thiofanát, triklabendazol.
- Imidazothiazoly (1960): širokospektrální insekticidy pouze proti hlísticím, např. levamizol, tetramizol, butamizol.

- Tetrahydropyrimidiny (1960): úzké spektrum účinnosti, např. morantel, oxanel, pyrantel.
- Isochinoliny (1970): proti tasemnicím, např. epsiprantel, praziquantel.
- Salicylanilidy (1970): úzkého spektra (hlístice, tasemnice, motolice), např. klosantel, niklosamid, oxyklozanid, rafoxanid.
- Další nepatří do těchto chemických tříd: klorsulon, monepantel, nitroscanát, nitroxinil, deriváty piperazinu.

Jak již bylo řečeno na počátku tohoto oddílu, z chemického hlediska existuje velká řada typů insekticidů lišících se jak strukturou, tak mechanismem působení. Typově existují i další insekticidy, které jsou nesyntetického původu; anorganického (minerálního, např. měď) či přímo získané z rostlin jako jsou pyrethriny (oddíl 2.2.6) či rotenony.

Za širší zmínku stojí pouze poměrně nový typ klasifikace týkající se tzv. bioracionálních insekticidů, které se dle US EPA diametrálně liší od běžných typů insekticidů [25]. Mají zásadně odlišné mechanismy působení, s čímž souvisí i snížení rizika nežádoucích účinků při jejich použití. Jedná se o jakékoliv látky přírodního původu (nebo podobné syntetické), které mají díky natolik specifickému mechanismu škodlivý či smrtelný dopad na konkrétně cílené škůdce a jsou netoxické pro člověka, jeho domácí rostliny a zvířata či životní prostředí. Také jsou propojeny s obecně nízkou spotřebou, rychlým rozkladem v prostředí a snižují závislost na konvenčních insekticidech. Dělí se na biochemické (hormony, enzymy, feromony, regulátory růstu) a mikrobiální (viry, bakterie, houby, prvoci, hlístice). US EPA tyto výrobky od roku 1990 nazývá také jako biopesticidy (ačkoliv význam bioracionální insekticidy a biopesticidy se mohou lehce lišit) a na konci roku 2001 bylo registrováno téměř 200 účinných látek zahrnujících téměř 800 produktů [14].

V následujících oddílech jsou probírány ty skupiny, ve kterých se vyskytují v této práci zkoumané insekticidy.

2.2.2 UŽITÍ INSEKTICIDŮ V OBOJKÁCH A SPOT-ON PŘÍPRAVCÍCH

Obojky impregnované insekticidy jsou obojky tvořené nejčastěji plasty či dalšími materiály připomínajícími tkáňovou strukturu, které obsahují účinnou látku a kočkám a psům se umísťují kolem krku s cílem ochránit je před nejběžnějšími parazity. V závislosti na účinné složce obojky většinou chrání proti blechám, klíšťatům, roztočům

a vším. Některé obojky zahrnují i ochranu proti komárům, mouchám a dalším létajícím parazitům. Účinné látky se smíchávají s plastem ještě před vytvrzením ve formě, či se přidávají jinými způsoby, aby se látky postupně z obojku uvolňovaly až po dobu několika měsíců. Obvykle lze počítat s dobou dvanácti týdnů, což je značně déle oproti spot-on přípravkům. Nicméně záleží i na konkrétní epidemiologické situaci.

Insekticid se postupným uvolňováním šíří po celé srsti a pokryje převážnou většinu povrchu zvířete. Aktivní látky se mohou uvolňovat několika mechanismy – otíráním, difuzí nebo odpařováním vlivem zvířecího tělesného tepla. V závislosti na konkrétních látkách obojky fungují jako odpuzující, sterilizační či parazity přímo zabíjí.

Většina zvířecích obojků je pro zvířata pohodlná, velmi snadno se s nimi manipuluje a bývají levnější než spot-on přípravky, avšak některé obojky mohou výrazně zapáchat (především ty, které obsahují organofosfáty). Využívají se spíše jako preventivní opatření, jelikož jejich nástup účinku oproti spot-on přípravkům je značně pomalejší. Dalším problémem je, že obojky, které jsou méně kvalitní, uvolňují většinu aktivní látky hned v prvních týdnech aplikace a ty jsou velmi rychle vyčerpány. Zvířata obojky zpravidla dobře tolerují, nicméně je vhodné mít na paměti, že některé aktivní látky jsou bezpečné pro psy, ale toxické pro kočky (např. pyrethroidy, amitraz) [1].

Do obojků se nejčastěji používají syntetické pyrethroidy (deltamethrin, cypermethrin, permethrin), organofosfáty (diazinon, chlorpyrifos), karbamáty (karbaryl, propoxur) a amidiny (amitraz). Některé obojky využívají i novější syntetické insekticidy jako neonikotinoidy (imidaciprid) či přírodní insekticidy, které spíše fungují jako repelenty. Insekticidní obojky se na trhu vyskytují přes 40 let [11] a jelikož mnoho z nich obsahuje vývojově starší insekticidy a akaricidy, snížila se proto během let jejich účinnost kvůli rezistenci parazitů (oddíl 2.1.9) [23]. To je také důvod, proč se čím dál více uplatňují přípravky s novějšími látkami.

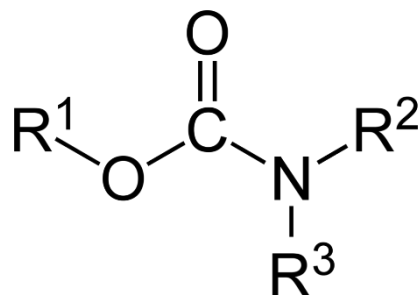
Spot-on jsou přípravky, které jsou uzpůsobeny k okamžitému použití na psech a kočkách. Jedná se o tekuté substance, které se nanášejí v jednom nebo ve dvou bodech (či skvrnách) na hlavu nebo na hřbetní linii u krku. Říká se jim také „bleší kapky“ a jsou určeny k jednorázovému použití v podobě malých plastových pipet. Používají se především proti blechám a klíšťatům, někdy také roztočům, vším a srdečním červům. Obsahují přesně jednu dávku pro psa či kočku (dle hmotnosti), aby došlo k pokrytí celého zvířete. Při aplikaci musí být srst zvířete suchá a čistá, jelikož by se přípravek nemusel

rozšířit žádoucím způsobem. Obecně se jedná o efektivní antiparazitika, která jsou pro majitele pohodlná a snadno aplikovatelná, což souvisí i s jejich vyšší pořizovací cenou.

Většina spot-on přípravků má pouze lokální efekt a zabíjejí parazity kontaktem s aktivní látkou (amitrazem, fipronilem, imidalcipridem, permethrinem atd.), přesto existují i přípravky, které fungují systémově, což znamená, že se nerozprostírají po celém těle zvířete, ale vstřebávají se kůží do krve a jsou distribuovány všude, kde parazité sají krev (selamektin; značky Stronghold, Revolution). Mezi nejběžněji používané aktivní látky patří amidiny (amitraz; toxický pro kočky), makrocyclické laktony (selamektin), neonikotinoidy (imidalciprid, značky Advantage, Advantix, Advocate), pyrazoly (fipronil, značka Frontline; pyriprol), spinosyny (spinetoram), pyrethroidy (etofenprox, cyphenothrin, permethrin, flumethrin, cypermethrin; většina je toxická pro kočky [1]).

2.2.3 KARBAMÁTOVÉ INSEKTICIDY – PROPOXUR

Karbamátové insekticidy jsou z chemického hlediska estery kyseliny karbamové (NH_2COOH). Syntéza a komercializace karbamátů probíhá od roku 1950 [26] a jako první úspěšný karbamát byl představen pravděpodobně v roce 1958 karbaryl (Sevin). Byl celosvětově využíván více než všechny ostatní karbamáty dohromady (během roku 1976 bylo použito na zemědělské plodiny v USA zhruba 11 tisíc tun aktivních látek [16]), což byl důsledek dvou příznivých vlastností: karbaryl má poměrně nízkou toxicitu u savců při styku s kůží i orálním kontaktu, a také je účinný proti velmi širokému spektru hmyzu.



Obrázek 9: Obecná struktura karbamátů – R^1 , R^2 , R^3 jsou alkylové či arylové skupiny (zdroj: wikipedia commons, Ben Mills)

Z chemického hlediska lze rozdělit karbamáty do tří skupin. Karbamátové herbicidy mají obecnou strukturu $\text{R}^3\text{NHC(O)OR}^1$ (kde R^1 a R^3 jsou aromatické a/nebo alifatické skupiny). Deriváty esterů kyseliny karbamové, kdy R^2 je vodík a R^3 methylová skupina, se využívají jako insekticidy (obr. 9). Jako třetí skupinu označujeme karbamátové fungicidy, které obsahují benzimidazolovou skupinu.

Lze obecně říci, že jednoduché estery a N-substituované deriváty kyseliny karbamové jsou nestabilní sloučeniny, a to především v alkalickém prostředí (rozkládají se na daný alkohol, fenol, amoniak, amin a oxid uhličitý). Herbicidní karbamáty jsou více stabilní vůči alkalické hydrolýze, než insekticidní. Na rozdíl od toho jsou soli a estery

substituované karbamové kyseliny stabilnější než kyselina samotná, což je základem pro syntézu mnoha derivátů, které lze využít jako biologicky aktivní látky. Karbamátové estery jsou obecně stále pevné krystalické látky a mají nízký tlak par a nízkou rozpustnost ve vodě. Jsou mírně rozpustné v rozpouštědlech jako benzen, toluen, xylen, chloroform, dichlormethan a 1,2-dichlorethan; obecně platí, že jsou špatně rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech, jako jsou ropné uhlovodíky, ale vysoce rozpustné v polárních organických rozpouštědlech, jako je methanol, ethanol, aceton, dimethylformamid aj.

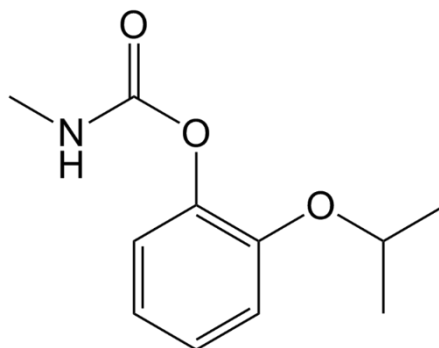
Mechanismus účinku je následující: karbamáty ovlivňují nervový systém parazitů (ale také savců, ptáků, ryb i dalších organismů) tak, že inhibují funkci acetylcholinesterasy (reversibilně oproti organofosfátům). Ta má za cíl ukončit přenos nervového signálu tím, že katalyzuje hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou. Tato reakce je nezbytná k tomu, aby se neurony po aktivaci vrátily do klidového stavu. Pokud však neurony zůstávají v nepřetržité excitaci a aktivitě, zásadně zasahují do běžného pohybu parazita – dochází k paralýze a následně k jeho smrti.

Protože jsou karbamáty starým typem antiparazitik, ztratily patentovou ochranu a jsou k dispozici i jako generika nejčastěji vyráběná v Číně, Indii, Izraeli či Brazílii. Mezi nejčastější karbamáty využívané pro domácí zvířata patří karbaryl, methomyl a propoxur. Dalšími karbamáty jsou např. karbofuran, aldikarb, oxamyl, thiodikarb, methiokarb, bendiokarb, karbosulfan, aldoxykarb, promekarb a fenoxycarb. Jako novější lze zmínit primikarb, indoxakarb (registrovaný v roce 2000), alanykarb a furathiokarb [11].

Propoxur

Propoxur (obr. 10) je 2-isopropoxyfenyl-N-methylkarbamát (nebo také Baygon, PHC, Unden či Blattanex) o sumárním vzorci $C_{11}H_{15}N_1O_3$ a molární hmotnosti 209,25 g/mol.

Jedná se o bezbarvou či bílou, případně až nahnědlou krystalickou látku nevýrazného zápachu o přibližném bodu tání 90 °C (86–91,5 °C). Je relativně stabilní ve vodě. Při pH 7 či nižším je jeho rozpustnost ve vodě velmi malá – 0,2 g na 100 ml (0,2 %) při 20 °C. Nicméně je rozpustný v organických rozpouštědlech, jako např.



Obrázek 10: Propoxur (zdroj: wikimedia commons)

v methanolu, acetonu, dichlormethanu, 2-propanolu, toluenu. V zásaditém prostředí je

velmi nestabilní a hydrolyzuje: poločas rozkladu je při 20 °C pro pH 10,8 asi 40 minut, pro pH 11,8 přibližně 11,5 minut a pro pH 12,8 asi 1 minuta. Také se rozkládá při zahřívání nebo spalování spolu s uvolněním toxických plynů včetně methylisokyanátu a oxidů dusíku. Při vystavení světlu nevykazuje žádný nebo jen minimální rozklad. Bylo zjištěno, že propoxur je jediný z šesti N-methylkarbamátů, který nebyl převeden na jiné inhibitory cholinesterasy při vystavení UV či viditelnému záření [27]. Z inertních povrchů se propoxur dostává více či méně rychle odpařováním v závislosti na typu povrchu.

Propoxur je nesystémový insekticid, který byl zavedený v roce 1959 [28] a v USA byl poprvé registrován v roce 1963 firmou Chemagr (dnes známou jako Bayer). Využívá se na potravinářské plodiny (třtinu, kakao, kukuřici, rýži, bavlnu) a má široké využití i proti komárům ve venkovních prostorech a v rámci zemědělského chovu a chovu domácích mazlíčků proti mouchám, klíšťatům i blehám. Také má značné využití jako akaricid na travnaté plochy proti mravencům, na kvetoucí rostliny a dokonce i mimo agrikulturní prostředí (v domovech a veřejných prostorách). Dále lze využít jako moluskocid a na hubení švábů, mšic a křískovitých. Propoxur je jednou z chemických látek, kterou se do určité míry nahrazuje DDT při kontrole muchničkovitých a komárů.

Využívá se v různých formách, dle INCHEMu jsou to nejčastěji smáčitelné prášky (50 %), práškové přípravky, granule, oleje, zvířecí obojky, emulgované koncentráty, spreje, návnady a koncentráty. Také se využívají v kombinaci s ostatními pesticidy jako např. s disulfotonem či methiokarbem [29].

Propoxur lze využívat v nemocnicích, továrnách a stájích jako insekticid o koncentraci 0,5 %. Z toxikologického hlediska je však důležité dbát bezpečnostních pokynů. Propoxur může být vstřebán inhalací, absorpcí kůží, pozřením či vniknutím do oka. Cílovými orgány jsou ledviny, játra, gastrointestinální trakt a centrální nervový systém. Mezi příznaky otravy patří rozmazané vidění, pocení, slinění, břišní křeče, nevolnost, průjem, zvracení, bolest hlavy, malátnost (slabost, vyčerpání) a svalové záškuby. U savců se jako hlavní metabolity propoxuru zdají být 2-hydroxyfenol-N-methylkarbamát a 2-isopropoxyfenol, který se později projevuje v moči jako glukoronid [30].

Propoxur je toxický pro ryby, ptáky, včely, hmyz i savce. Při jedné dávce pokusným potkanům se při orálním podání jako LD₅₀ ustanovila hodnota 116 mg/kg pro samce a 95 mg/kg pro samice. Pro člověka bylo jako nebezpečná dávka stanoveno 1,5 mg/kg při orálním podání, která asi po 20 minutách způsobuje rozmazané vidění,

pocení, zvracení a redukci funkce cholinesterasy na 27 % po dobu jedné hodiny. Zatím nebylo prokázáno, že by při vykonávání povolání došlo k otravě propoxurem s fatálními následky.

2.2.4 REGULÁTORÝ RŮSTU – (S)-METHOPREN

Pro regulátory růstu (insect growth regulators, IGR) se také používají zkratky IDI (insect development inhibitors), IGD (insect growth disruptors) nebo také biopesticidy (oddíl 2.2.7). Nejčastěji se využívají pro boj s klíšťaty, vešmi, masačkami, mouchou domácí a u psů a koček především proti blehám či v kombinaci s adulticidy. Jak už název napovídá, regulátory růstu jsou látky, které přerušují vývoj nedospělých stádií parazitů, což se děje dvěma hlavními způsoby. Buď zasahují do líhnoucích procesů jednotlivých vývojových stádií, jako jsou larvy a nymfy, nebo dochází přímo k prevenci líhnutí vajíček, které jsou pokládány dospělými jedinci. V obou případech dochází k přerušení vývojového cyklu a populace tak klesá nebo je přímo vyhubena.

IGR nelze zařadit jako konkrétní chemickou skupinu insekticidů, a proto je lepší na ně pohlížet jako na „funkční“ skupinu, protože chemicky patří jednotliví zástupci do nezávislých chemických tříd. Přesto existují dva hlavní typy inhibitorů v závislosti na fyziologickém procesu. Buď zasahují do syntézy chitinu (CSI), nebo dochází k tvorbě analogů juvenilních hormonů (JHA).

Chitin je polysacharid složený z molekul N-acetyl-D-glukosaminu a je hlavní stavební jednotkou kutikuly hmyzu, klíšťat, roztočů a dalších členovců, která představuje důležitou součást exoskeletu. Jelikož je exoskelet hmyzu velmi tuhý, je nezbytné, aby se během svého vývoje mohl hmyz svlékat, růst a vytvářet novou kutikulu. Inhibice vyklubání spočívá v tom, že larvy vyvíjící se ve vajíčku musí svlékat pokožku ještě před vyklubáním – inhibitory chitinu způsobují brždění jeho syntézy a jeho správné uložení v kutikule, což vede k tomu, že se larva nebo nymfa nedokáže správně vyklubat a dochází tak k jejímu uhynutí. Většina syntetických inhibitorů chitinu patří mezi benzoylfenyluráty, které byly představeny ve střední Americe roku 1985 společností Bayer of Germany, např. diflubenzuron (širokospektrý larvacid, především proti mouše domácí a vším), fluazuron (specifický inhibitor u skotu pouze proti klíšťatům), lufenuron (proti blehám u psů a koček) a triflumoron (proti mouše domácí a vším), flufenoxuron [14].

JHA napodobují aktivitu přirozeného juvenilního hormonu v průběhu vývoje hmyzu. Obecně lze říci, že vývoj hmyzu je regulován dvěma hlavními hormony:

ekdysonem a juvenilním hormonem neoteninem (oba vznikají v předohrudní žláze). Neotenin udržuje larvální vývojové stádium a na jeho konci se přestává tvořit a kvůli jeho nedostatku dochází k metamorfoze larvy v dospělého jedince. Aktivací ekdysonu vzniká ekdysteron, který způsobuje zvětšování pokožkových buněk, načež se dělí a rozpadají, a tím je umožněno svlékání hmyzu. Pokud dochází ke stálému přísunu neoteninu, dochází k rozporu s larválním líhnutím a jedinec tak uhyne, nebo se ani nevyklube, čímž se rapidně reguluje populace. Většina JHA je širokospektrých, ale nemají žádný účinek proti klíšťatům a roztočům. Nejčastěji využívané látky jsou pyriproxifen a methopren [31].

Většina IGR má velmi nízkou toxicitu pro savce, jelikož působí na molekulární mechanismy, které existují pouze u členovců. Díky tomu jsou pro lidi, hospodářská a domácí zvířata bezpečnější než většina jiných antiparazitik. Jsou zcela bezpečné také pro ptáky, ryby, plazy, obojživelníky a další obratlovce. Přestože jsou IGR většinou širokospektrá, mohou představovat hrozbu pro půdní a vodní bezobratlé, kteří jsou součástí potravinového řetězce, jelikož mohou poměrně dlouho dobu zůstat v životním prostředí (např. pyriproxifen).

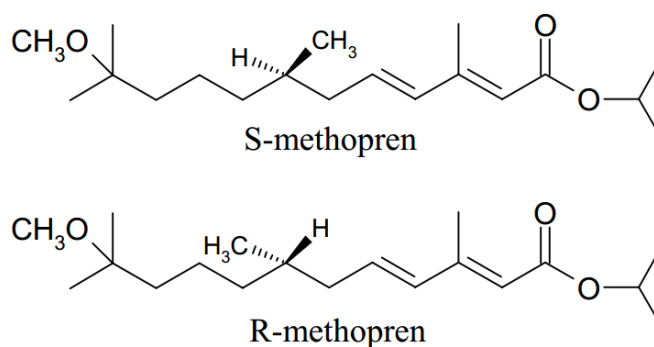
Protože jsou IGR také starým typem antiparazitik, ztratily patentovou ochranu a jsou k dispozici jako generika nejčastěji vyráběná v Číně, Indii, Izraeli či Brazílii.

Methopren

Jedná se o isopropyl-(2*E*, 4*E*)-11-methoxy-3,7,11-trimethyl-2,4-dodekadienoát o sumárním vzorci $C_{19}H_{34}O_3$ a molární hmotnosti 310,48 g/mol. Jeho komerční názvy jsou např. Altosid, Apex, Dicacan, Dianex, Minex, Precor či Kabat. Jako aktivní látku zpravidla využíváme jeden z enantiomerů (obr. 11), a to S-methopren: isopropyl-(2*E*, 4*E*, 7*S*)-methoxy-3,7,11-trimethyldodeka-2,4-dienoát.

Jako konvenční pesticid (pomalu působící selektivní larvicid) byl poprvé registrován

u US EPA v roce 1975 a S-methopren později v roce 1985. V čistém stavu se jedná o oranžovou nebo světle žlutou kapalinu se slabou ovocnou vůní



Obrázek 11: Methopren – S a R enantiomery (zdroj: Dr. Yibing He, FAO dokument)

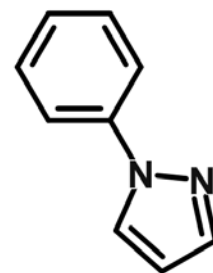
o bodu varu zhruba 100 °C při tlaku 6,67 Pa (0,05 mm Hg) [32] a hustotě 0,9261 g/ml při 20 °C, prakticky nerozpustnou ve vodě (1,39 mg/l za pokojové teploty), ale rozpustnou v organických rozpouštědlech. Jedná se o stabilní sloučeninu, ačkoliv nepersistentní, protože se rozkládá především na CO₂ a ve vodě za přítomnosti světla poměrně rychle degraduje i za normálních podmínek (poločas rozkladu je zhruba 30 hodin při 0,001 mg/l). Stabilní je ve sterilním vodném roztoku (0,5 mg/l) při pH 5, 7 a 9. Při zahřívání se rozkládá a jak bylo řečeno, velmi rychle degraduje pod vlivem UV záření – poločas rozkladu je méně než jeden den a něco přes čtyři týdny ve tmě. Proto ho není vhodné používat na plochy či zvířata, která jsou vystavena intenzivnímu slunečnímu záření.

Nejčastěji se využívá na boj s mouchami, komáry, brouky, blechami a mravenci rodu *Solenopsis*. Je ale důležité zdůraznit, že působí na vajíčka a larvy, nikoliv na dospělé jedince. Je vhodný pro kontrolu vodních a zavodněných ploch a také se využívá ke kontrole hmyzu při výrobcích v rámci potravinářského průmyslu. Nejčastěji je k dispozici jako aditivum do potravin, spot-on přípravků, šampónů, mýdel, sprejů a obojků.

Methopren je selektivní typ insekticidu, tudíž má podle informací US EPA z roku 1982 extrémně nízkou akutní toxicitu pro savce (LD₅₀ 36,5 g/kg) při požití či inhalaci a je pouze lehce toxický při dermální absorpci, nedráždí oči ani pokožku [33]. To obecně platí pro veškeré necílové druhy, kromě vodních bezobratlých. U potkanů je při orálním podání LD₅₀ pod 24 g/kg a u psů orientačně 5–10 g/kg [34]. Methopren nebyl prokázán jako kumulativní jed, nemá vliv na reprodukční činnost ani není teratogenní, karcinogenní či mutagenní. Zatím nejsou známy žádné případy, kdy by došlo k otravě člověka. Při požití se u savců velmi rychle metabolizuje hepatocytárními esterasami především na methoprenovou kyselinu, která podléhá α -oxidaci a β -oxidaci, přechází na acetát a Krebsovým cyklem na CO₂ či jiné intermediální metabolity a následně kompletně přechází do moči a exkrementů.

2.2.5 FENYLPYRAZOLY (FIPROLY) – FIPRONIL

Fenylpyrazoly (obr. 12) patří mezi relativně moderní třídu pesticidů, jelikož byly představeny na počátku 90. let 20. století jak pro využití v zemědělství jako herbicidy, tak i ve veterinární oblasti. Chemicky jsou odvozeny od struktury 1-fenylpyrazolu a mají široké spektrum účinnosti jako



Obrázek 12: 1-fenylpyrazol
(zdroj: chemspider.com)

antiparazitika a akaricidy proti řadě parazitů jako jsou blechy, mouchy, klíšťata, vši a roztoči. Nejčastější formou aplikace jsou spot-on přípravky a návnady na šváby, mravence a termity. Tyto látky jsou velmi lipofilní, takže se při místní aplikaci na zvíře ukládají v mazových žlázách pokožky, odkud se postupně uvolňují, což umožňuje poměrně dlouhý reziduální účinek.

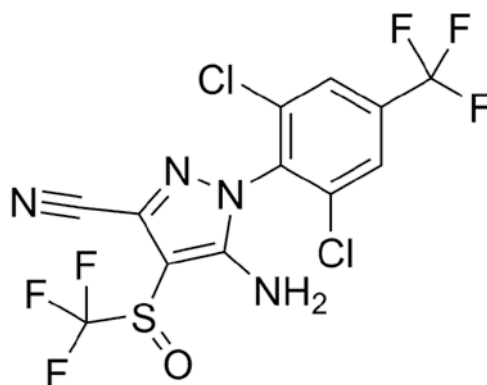
Fenylpyrazoly jsou GABA (kyselina gama-aminomáselná) inhibitory, což jsou klíčové neurotransmitery v centrálním nervovém systému a regulátory chloridových kanálů. Tento mechanismus existuje nejen u hmyzu, ale také u savců a dalších obratlovců. Nicméně fenylpyrazoly se zdají být u obratlovců méně účinné než u bezobratlých, což umožňuje určitý stupeň selektivity. U člověka je GABA přímo odpovědná za regulaci svalového tonu a u hmyzu vykazuje excitační účinky, zprostředkovává aktivaci svalů na synapsích mezi nervy a svalovými buňkami a také stimuluje některé žlázy. Lze tedy zjednodušeně říci, že dochází k narušení schopnosti nervových buněk přenášet nervové impulsy a výsledkem je neuronální hyperexcitace kvůli hromadění GABA v synaptických křižovatkách vedoucí ke smrti hmyzu [35].

Jako první pyrazol na trhu byl fipronil (obr. 13) (pro kočky, psy a občas dobytek), který již také ztratil patentovou ochranu a lze ho distribuovat jako generikum. Druhou známou aktivní látkou v této skupině je pyriprol (pouze pro psy). Jejich výhodou je, že zatím působí i na hmyz, který již je rezistentní vůči pyrethroidům, organofosfátům a karbamátovým insekticidům.

Fipronil

Fipronil je (*RS*)-5-amino-1-(2,6-dichlor- α,α,α -trifluor-*p*-tolyl)-4-[(trifluormethyl)sulfinyl]pyrazol-3-karbonitril o sumárním vzorci $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ a molární hmotnosti 437,15 g/mol. Komerčně je známý pod názvy Regent, Frontline, Combat, MaxForce či Termidor.

Jedná se o insekticid, který byl objeven a vyvinut společností Rhône-Poulenc v letech 1985–1987 a uveden na trh roku 1993 (v USA



Obrázek 13: Fipronil (zdroj: wikimedia commons)

registrován poprvé roku 1996 [14]). A ačkoliv se jedná o velmi účinnou látku proti řadě škůdců, stále existují obavy o jeho vlivu na životní prostředí a lidské zdraví. Momentálně

je ale přístupný na trhu v mnoha průmyslových i rozvojových zemích a jeho užívání se po celém světě zvyšuje. Výroba v roce 1997 byla kolem 480 tun ročně a očekávalo se, že se v roce 2000 zvýší až na 800 tun [36].

V základním stavu je fipronil bílý prášek zapáchající po plísni. Jako experimentální bot tání byl určen rozsah mezi 200–201 °C. Fipronil je mírně rozpustný ve vodě (1,9 mg/l pro pH 5 a 2,4 mg/l pro pH 9 při 20 °C). Preferuje lipofilní organické matrice, jako jsou lipidy, oleje, lignin, bílkoviny a organická rozpouštědla – například rozpustnost pro hexan je 28 mg/l a toluen 3000 mg/l. Při normálních teplotách je stabilní po dobu jednoho roku, nicméně přítomnost kovových iontů jeho stabilitu narušuje, stejně jako vliv slunečního světla (UV), pod kterým degraduje na různé metabolity. Jedním z nich je fipronil-desulfynil, který je stabilní a toxičtější než samotný fipronil, jelikož je u savců až dvacetkrát aktivnější v chloridových kanálech (LD_{50} 15–18 mg/kg). Podléhá však hydrolyze v bazickém prostředí a poločas rozkladu při pH 5,5 až 7 je pod 100 dní, při pH 10 jen 4,75 dne a při pH 12 dokonce jen 2,4 hodiny.

Jeho využití je velmi širokospektré. V letech 1987 až 1996 byl využíván pro hubení více než 250 druhů škůdců a ošetření 60 typů plodin (rýže, bavlny) po celém světě. Využívá se jako granule a návnady proti různým typům motýlů a rovnokřídlých, mravencům, krtonožkám či proti larvám brouků v půdě. Je též účinný proti švábům a termitům jako tekutý prostředek. Ve veterinární oblasti se využívá jako spot-on proti blechám, klíšťatům, mravencům, švábům a termitům [35].

Fipronil je neurotoxický jak pro potkany, tak i pro psy, nicméně pro savce je méně nebezpečný než pro ryby (např. pro kapry LC_{50} (69 h) je 430 µg/l), ptáky a bezobratlé. Pro potkany při orálním podání je LD_{50} 97 mg/kg a pro myši 95 mg/kg [37]. Dermální absorpce u potkanů je pod 1 % po 24 hodinách a toxicita je tímto způsobem tedy považována za nízkou [38]. Při léčbě psů a koček sprejem obsahujícím fipronil byl zaznamenán nízký výskyt závažných kožních onemocnění, nejčastěji se jednalo o podráždění pokožky, která může být spojena se ztrátou srsti v místě aplikace. Existují také dohady, že psi jsou citlivější než kočky. Studie ukazují, že fipronil je pro potkany karcinogenní a způsobuje rakovinu štítné žlázy. Má také vliv na reprodukční schopnosti – dochází ke snížení velikosti potomků ve vrhu, snížení hmotnosti a snížení četnosti páření.

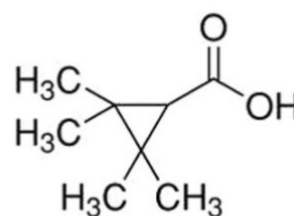
Toxicita u lidí není dostatečně prozkoumána. Fipronil byl WHO klasifikován do třídy II a přímý krátkodobý kontakt s pokožkou může vést k mírnému podráždění. Při konkrétních případech, kdy došlo k požití fipronilu se jako příznaky objevuje pocení,

nevolnost, zvracení, bolesti hlavy, bolest břicha, závratě, slabost a křeče. Klinické příznaky vystavení fipronilu jsou obecně reverzibilní a odeznívají spontánně samy [39]. Residua fipronilu lze nejvíce nalézt v tukových tkáních, ale většina se ho vyloučí v podobě metabolitů močí a exkrementy.

Výše dávek, při kterých fipronil u potkanů vede k rakovině štítné žlázy, je velmi vysoká, nicméně je nepravděpodobné, že dojde za běžných podmínek k takovému požití. Je stále diskutováno, zda může dojít k ohrožení lidského zdraví, což je oprávněná obava, jelikož např. v rozvojových zemích je nedostatek ochranných prostředků a zvyšuje se tak riziko kontaktu s výrobkem za vyšších teplot.

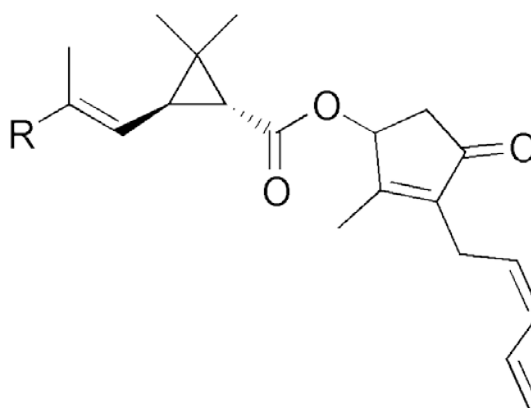
2.2.6 PYRETHROIDY – PERMETHRIN, FLUMETHRIN

Pyrethroidům se také říká syntetické pyrethroidy, jelikož se jedná o syntetické analogy pyrethrinů, což jsou dvě přírodní organické viskózní kapaliny pyrethrin I a pyrethrin II, též s insekticidním účinkem. Jsou to navzájem příbuzné estery kyseliny chryzantémové (obr. 14) s cyklopropanovým jádrem. Liší se však oxidačním číslem na jednom atomu uhlíku a podléhají snadno degradaci vlivem světla či kyslíku.



Obrázek 14: Kyselina chryzantémová (zdroj: exportpages.cz)

Pyrethriny (obr. 15) jsou obsaženy v obalech semen kopretiny stračkolisté (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), která se kvůli tomu začala komerčně pěstovat jako jejich zdroj. Většina jejich světové produkce pochází z východní Afriky z Keni, kde se začala pěstovat koncem 20. let 20. století [40]. Jejich chemickou strukturu v roce 1924 publikovali Hermann Staudinger a Lavoslav (Leopold) Růžička. Následně byl v 50. letech představen první syntetický pyrethroid allethrin, který se velmi rychle rozkládá na světle a je méně účinný než přírodní pyrethriny. Během 60. a počátkem 70. let přišla na řadu druhá generace pyrethroidů (tetramethrin, fenothrin) a následovala třetí generace (fenvalerát, permethrin) s lepší odolností vůči UV záření a poslední generace



Obrázek 15: Pyrethrin I, R = CH₃ a Pyrethrin II, R = CO₂CH₃ (zdroj: wikimedia commons)

(cypermethrin, deltamethrin, cyfluthrin, cyhalothrin, flumethrin) byla představena na konci 70. let, čímž významně přispěla k obrovskému úspěchu syntetických pyrethroidů v zemědělství, veterinární praxi a hygieně. Po zavedení byly syntetické pyrethroidy velmi úspěšné a nahradily řadu výrobků, které obsahovaly chlororganické látky, karbamáty, organofosfáty a amidiny. Hlavním důvodem byla jejich výrazně nižší toxicita pro savce a ptáky než vykazovali jejich předchůdci.

Pyrethriny i pyrethroidy působí jako neurotoxiny, a v dávkách, které nejsou smrtelné, vykazují repelentní účinky. Jejich mechanismus účinku funguje na principu axonového jedu, kdy blokují sodíkové kanály neuronových membrán hmyzu – kanály zůstávají otevřené, nedochází tedy k depolarizaci a nervy jsou trvale drážděny a organismus je paralyzován; hmyz umírá na udušení. K těmto látkám se často jako synergista přidává piperonylbutoxid (inhibitor klíčových mikrosomálních oxidasových enzymů), který zvyšuje účinnost, jelikož hmyzu zamezuje pyrethriny eliminovat z těla.

Mezi pyrethroidy dále patří bifenthrin, cyphenothrin, empenethrin, imiprothrin, kadethrin, prallethrin, resmethrin, sumithrin, tralomethrin a transflumethrin. Starší typy syntetických pyrethroidů jsou estery kyseliny chryzantémové a jejich deriváty, nicméně novější sloučeniny jako např. flucythrínát jsou však již výrazně odlišné.

Permethrin

Permethrin je (3-fenoxyfenyl)methylester kyseliny 2,2-dimethyl-3-(2,2-dichlorovinyl) cyklopropankarboxylové (Ambush, Transpermethrin, Elimite, Acticin) o sumárním vzorci $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$ a molární hmotnosti 391,28 g/mol.

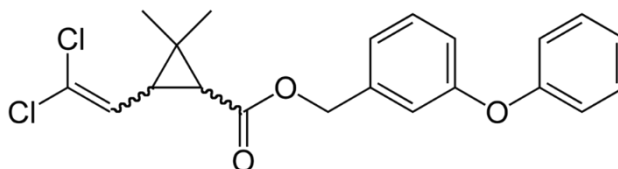
Cis izomer permethrinu se vyskytuje jako bezbarvá nebo nažloutlá krystalická látka o bodu tání 34 °C. Směs *cis* a *trans* izomerů (obr. 16) je běžně hnědá viskózní kapalina o teplotě varu 200 °C a hustotě

1,19–1,27 g/cm³ při 20 °C.

Skupenský stav samozřejmě závisí na poměru izomerů, nicméně čistý permethrin (*cis:trans* poměr 40:60)

je bezbarvá kapalina. Je extrémně

hydrofobní, jeho rozpustnost ve vodě je 5,5 µg/l. Je ale rozpustný ve většině organických rozpouštědel, jako aceton, ethanol, ether a xylén (výjimkou je glykol). Hydrolyticky je při pH 5 a 7 při 20 °C stabilní. Permethrin má čtyři stereoizomery (dva enantiomerní páry),



Obrázek 16: Permethrin (zdroj: wikimedia commons)

vyvstávající ze dvou stereocenter v cyklopropanovém kruhu. Enantiomerní dvojice *trans* je známa jako transpermethrin.

Původně byl permethrin registrován US EPA v roce 1979 a registrace byla obnovena roku 2006 [41]. Nejvíce se využívá v zemědělství především pro ochranu bavlny, pšenice, kukuřice a tolice a také proti parazitům na kuřatech nebo jiné drůbeži. V rámci Evropy má značný význam pro ošetřování dřeva proti dřevokaznému hmyzu. Používá se proti mravencům a termitům a ve zdravotnictví je účinný proti vším a zákožce svrabové (*Sarcoptes scabiei* L.). V tropických oblastech se permethrin používá k prevenci nemocí přenášených komáry, například horečky dengue, nebo malárie, impregnací moskytiér. Dále se přidává do veterinárních přípravků pro psy.

Problémem permethrinu je skutečnost, že se nejedná o selektivní insekticid a ačkoliv není známo, že by byl škodlivý pro většinu savců (LD₅₀ při orálním podání potkanům je velmi široké rozpětí 430–4000 mg/kg a pro myši 540–2690 mg/kg [37]) a ptáků, je velmi toxický pro ryby, kočky, myši, ale i pro mnoho užitečného hmyzu, jako je například včela medonosná (*Apis mellifera*) – LD₅₀ 0,05 µg/včelu [42]. Kožní expozice u koček a psů může způsobit dočasnou parestézii a neurologické příznaky (kmitání tlapkami, škubání uší nebo ocasu a záškuby kůže spojené s válením se po zemi). U koček se mohou objevit deprese, ataxie, zvracení, nechutenství, třes nebo křeče. Příznaky mohou trvat několik minut až tři dny po expozici.

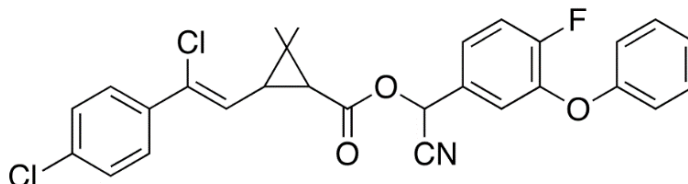
Existuje mnoho důvodů, proč jsou kočky vůči permethrinu náchylnější – mnoho koček zahynulo poté, co na ně byly aplikovány přípravky proti blechám určené pro psy, nebo po kontaktu se psy čerstvě ošetřenými přípravky s permethrinem [43]. Kočky mají nižší hmotnost, nicméně poměrně velkou plochu pro aplikaci přípravku a tudíž u menších jedinců dochází k přijmutí vyšší dávky v mg/kg. Kromě toho pyrethroidy se vylučují až v oxidované nebo glukuronidované formě. Kočky mají sníženou aktivitu konjugčních enzymů, metabolizují tak pyrethroidy výrazně pomaleji než psi, což může přispívat k akumulaci metabolitů a menší schopnosti detoxikace [43].

Permethrin je dle EPA klasifikován jako pravděpodobný lidský karcinogen, a to na základě reprodukovatelných studií u myši krmených permethrinem, u kterých došlo k výskytu nádorů jater a plic. Dále existuje podezření na karcinogenní účinek na buňky nosní sliznice při inhalaci [44].

Flumethrin

Flumethrin je α -kyano-4-fluoro-3-fenoxybenzyl-3-(β ,4-dichlorostyryl)-2,2-dimethylcyklopropankarboxylát (komerčně Acarin, Bacdip, Bayticol, Bodygard, Drastic, Kiltix, Seresto) o sumárním vzorci $C_{28}H_{22}Cl_2FNO_3$ a molární hmotnosti 510,38 g/mol. Využívá se na boj s klíšťaty, vešmi a na boj s kleštíkem včelím (*Varroa destructor*).

Flumethrin (obr. 17) byl ve Velké Británii poprvé představen roku 1986 firmou Bayer a patří tak do poslední generace pyrethroidů [12]. Za běžných podmínek se vyskytuje



Obrázek 17: Flumethrin (zdroj: trc-canada.com)

jako olejová kapalina nažloutlé až červeno-hnědé barvy charakteristického zápachu o hustotě 1,013 kg/l při 20 °C a o teplotě vzplanutí 66 °C; bod varu je nad 250 °C. Je emulgovatelný s vodou (200 mg/l při 20 °C). Rozpustnost v xylenu je 250 g/l a v ethylacetátu 250g/l při 20 °C. Jedná se o komplexní směs stereoizomerů, jelikož molekula obsahuje tři asymetrické uhlíky. Je přítomna *cis-trans* izomerie na cyklopropanovém kruhu a také *cis-trans* izomerie na dvojné vazbě C=C alkenu. Proto celkem existuje 16 různých izomerů. Komerční forma flumethrinu obvykle obsahuje 92 % *trans* izomeru na cyklopropanovém kruhu a *cis* konfiguraci na olefinové dvojné vazbě a 8 % izomeru s *cis* konfigurací na cyklopropanovém kruhu a *cis* konfigurací na dvojné vazbě [45].

Z toxikologických studií lze soudit, že pro člověka je únosná denní dávka flumethrinu 0–4 µg/kg. Při orálním podání potkanům je LD₅₀ 41–3800 mg/kg (v závislosti na nosiči – olejovém nebo vodném), dermálně > 2000 mg/kg a inhalací je LC₅₀ 225 mg/m³. Pro psy je bezpečnou hraniční dávkou 0,88 mg/kg/den (studie byla prováděna po dobu 13 týdnů). Nejčastější příznaky intoxikace jsou nekoordinované pohyby, hyperreaktivita, třes, parestézie, letargie, únava, slintání, zvracení, průjem a inkontinence [46].

2.3 ANALYTICKÉ METODY POUŽÍVANÉ K IDENTIFIKACI INSEKTICIDŮ

Identifikace insekticidních látek je trvalou výzvou pro analytické chemiky. Vzhledem k tomu, že využití insekticidů je velmi širokospektré a kromě veterinární praxe se využívají především v potravinářském průmyslu, je Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) zodpovědný za to, aby US EPA dohlížela na dodržování stanovených hodnot reziduí pesticidů v potravě a krmivech pro zvířata. FDA shromažďuje a analyzuje potraviny z daných obchodních kanálů a údaje zachovává dle předpisu Federal food, drug, and cosmetic act [47]. Tyto údaje jsou ale také využívány v rámci výzkumu insekticidů, jejich výzkumu v otázce bezpečnosti a analýzy reziduí. K dispozici je proto Manuál analytických metod pro určování pesticidů (PAM, Pesticide analytical manual), který se používá jako úložiště metod používaných v laboratořích FDA ke zkoumání reziduí v potravinách [48]. Funguje jako metodika a soupis doporučených přístupů k analýze. PAM je rozdělený do dvou sekcí dle rozsahu analytických metod. V prvním oddílu jsou multireziduální metody (MMR), které se využívají na rutinní bázi kvůli jejich účinnosti a širokému uplatnění a v druhém oddílu jsou metody určené pro analýzu konkrétních sloučenin, které nejdou určit běžnými metodami, nebo když metody nejsou ještě dostatečně známé.

Také Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD, Organisation for economic co-operation and development) v dokumentu Guidance document on pesticide residue analytical methods [49] uvádí několik klíčových parametrů pro zajištění vhodných analytických metod.

Vzhledem k tomu, že při aplikaci analytických metod může docházet ke statistické chybě při interpretaci nebo měření, FDA vyžaduje využívat důvěryhodné analytické metody. Proto FDA zavedla dva přístupy, jedním z nich je, že se k potvrzení totožnosti reziduí využívá plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Druhým je využití méně přesných technik (například další chromatografické metody jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie), nicméně je nutné, aby rezidua a standardy byly identické i při různých způsobech měření [50].

Mezi nejčastěji využívané metody pro identifikaci insekticidů patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, high-performance liquid chromatography) a plynová chromatografie (GC, gas chromatography), nicméně lze dohledat na úrovni jednotlivých odborných článků, že je možné využít pro zkoumané látky i řadu dalších metod.

Jako nejvyžívanější analytické metody pro identifikaci propoxuru se uvádí plynová (GC) či tenkovrstvá chromatografie (TLC, thin-layer chromatography) a infračervená spektroskopie (IR, infrared radiation). Vzhledem k rychlému metabolizování propoxuru je nepravděpodobné, že je možné naměřit jeho přítomnost v lidských tkáních, nicméně Stanley a Thorton popsali analýzu propoxuru a jeho metabolitů v živočišných tkáních a mléku za pomoci plynové chromatografie [51]. Pomocí kolorimetrické a chromatografické metody popsal Dawson vyloučené fenolové látky odvozené od propoxuru v moči [52]. Jiné metody pro stanovení reziduí zahrnují spektrofotometrické metody [53] a chromatografické analýzy za použití dansylchloridu [54]. I když výše uvedená plynová chromatografie je poměrně časově náročná, jedná se o velmi citlivou metodu.

Při mapování reziduí methoprenu se využívá nejvíce plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID, gas chromatography – flame ionization detector), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a bylo zaznamenáno i využití imunochemické metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [55]. Rezidua se nejprve extrahují rozpouštědly (acetonitrilem, směsí acetonu/hexanu, hexanem, methanolem, isooktanem) a lipidové extrakty se za nízké teploty podrobí srážení a filtraci s cílem odstranění tuku. Na přečištění se využívá sloupcová chromatografie (florisil, silikagelové kolony). Methopren se následně analyzuje zmíněnými metodami GC-FID, HPLC-UV nebo ELISA [56].

Pro identifikaci reziduí fipronilu se nejčastěji využívá plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (GC-ECD, gas chromatography – electron capture detector) [57], plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, gas chromatography – mass spectrometry) [58, 59], plynová chromatografie s dusíko-fosforový detektorem (GC-NPD, gas chromatography – nitrogen-phosphorus detector) [60], HPLC na nepolárních adsorbentech (RP-HPLC, reverse phase HPLC) [61]. Dále také kapalinová chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií (LC-MS, liquid chromatography – mass spectrometry) nebo gelová chromatografie (GPC, gel permeation chromatography) [62].

Pro identifikaci permethrinu a jeho reziduí se využívá infračervená spektroskopie (IR), kapalinová chromatografie, plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID) [63] nebo s detektorem s elektronového záchytu (GC-ECD)

a plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/SIM-MS, gas chromatography-selected ion monitoring-mass spectroscopy [64]).

Analýza reziduí flumethrinu je obvykle prováděna pomocí HPLC, která je schopna určit i samotný flumethrin a v některých případech i flumethrinovou kyselinu jako převládající metabolit.

Hmotnostní spektrometrie sama o sobě však není dle dosavadního šetření metodou, která by představovala rozšířený způsob využívaný pro identifikaci insekticidů, a z toho důvodu není k dispozici mnoho odborných prací, jež by referovaly o její aplikaci. Ze stejného důvodu také nejsou dobře dostupná hmotnostní spektra látek, ani dostatečné množství informací, jak byly vzorky připravovány pro analýzu.

2.4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

2.4.1 HISTORICKÝ VÝVOJ

Hmotnostní spektrometrie má velmi dlouhou a rozmanitou historii s mnohými zásahy moderních inovací a cesta jejího vývoje je dlážděna několika Nobelovými cenami. Rozvoj metody lze datovat již od konce 19. století, kdy došlo k objevu principu pohybu kladně či záporně nabitých částic v magnetickém a elektrickém poli.

V roce 1886 Eugen Goldstein objevil kladně nabitě kanálové paprsky pozorováním záření v plynu, který byl vypouštěn za nízkého tlaku od anody ke katodě (naproti proudilo opačně nabitě záření). Jedná se o trubici, ve které probíhá doutnavý výboj (z trubice se postupně odčerpává vzduch a při snížení tlaku se objevuje úzký pruh výboje, který se postupně rozšiřuje – výhodou je nízká teplota elektrod i trubice) a proti sobě se pohybují elektrony

a kladně nabitě ionty. Pokud je v katodě otvor, pronikají kladné ionty za katodu (kanálem). Odtud název „kanálové paprsky“, které lze pozorovat jako světélkování plynné náplně [65].

Na E. Goldsteina následně navázal Wilhelm Wien, který zjistil, že při umístění kanálových paprsků do silných elektrických či magnetických polí dochází k jejich odchýlování. V roce 1899 pak sestavil přístroj, který se skládal z paralelních elektrických a magnetických polí, kdy oddělování paprsků podle m/Q poměru (m je hmotnost a Q je náboj fragmentu) závisí na druhu plynu ve výbojce. Za zakladatele hmotnostní spektrometrie jako takové lze považovat Josepha J. Thomsona (1856–1940), který právě v 19. století uveřejnil svou práci o analýze nabitých částic v parabolickém hmotnostním spektrografu a navázal tak na Wiena [66].

Roku 1918 J. J. Dempster zrealizoval první analýzu těkavých organických sloučenin. Pro tento účel vyvinul přístroj fungující na základě magnetického pole, kde jsou molekuly plynu ionizovány svazkem elektronů. Tato technika se dodnes využívá a je známa jako ionizace pomocí elektronového nárazu (EI) [67]. Během dalších desetiletí pak následovaly nové a nové pokroky – zprvu za účelem objevu nových stabilních izotopů, zjišťování zastoupení izotopů a jejich atomové hmotnosti a také pro studium metabolismu v období před druhou světovou válkou.

Právě v rámci vojenských potřeb vývoj hmotnostní spektrometrie našel uplatnění během 40. let 20. století při projektu Manhattan pro výrobu atomové bomby [68] a také pro sledování produktů ropného průmyslu. Tyto události předcházely masové výrobě

a komerčnímu využití hmotnostních spektrometrů. V dalších letech (1946–1953) také došlo k objevení principů kvadrupólového analyzátoru (W. Paulem, komerční využití odstartovalo v 60. letech) a dále iontové cyklotronové rezonance nebo průletových analyzátorů.

Carl-Ove Andersson roku 1958 použil poprvé hmotnostní spektrometrii k analýze aminokyselin a peptidů a označil u iontů stěžejní fragmenty sledované při ionizaci metylesterů [69]. Během 60. a 70. let pak dochází ke spojení hmotnostní spektrometrie s plynovou a kapalinovou chromatografií, což bylo velkým přínosem pro analýzu komplikovaných směsí organických látek [70].

K zásadnímu průlomů však došlo v 80. letech, kdy byly zavedeny další možnosti způsobu ionizace, a to pomocí elektrospreje (ESI) (J. Fenn) nebo matrice (MALDI) (F. Hillenkampf a M. Karas), což radikálně posunulo spektrum možností využití metody na další typy sloučenin, mezi něž patřily například biomakromolekuly či polární látky. Hans Dehmelt a Wolfgang Paulov pak obdrželi Nobelovu cenu za fyziku v roce 1989 za rozvoj iontové pasti [71].

K vývoji metod ionizace elektronovým paprskem bylo zapotřebí téměř padesát let, než je bylo možné využívat a umožnit tak ionizovat termolabilní molekuly a molekuly o vysokých molekulových hmotnostech, což bylo nezbytné pro analýzu léčiv a dalších sloučenin, jež se zapojují do biologických procesů [72]. Během posledních dvaceti let dochází k rozvoji hmotnostních analyzátorů, a tedy rozšíření možností separace iontů. Před 12 lety (2002) byla udělena Nobelova cena za chemii Johnu Bennettu Fennovi za další vývoj ionizujícího elektrospreje (ESI) a Koičimu Tanakovi za rozvoj šetrné laserové desorpce (SLD) a její využití pro ionizaci biologických makromolekul, především proteinů [73].

Do praxe byly zavedeny technologie na principu iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací, orbitrap, lineární iontové pasti a rozšířily se i přístroje s hybridním tandemovým uspořádáním, například spojení kvadrupólu a průletového analyzátoru [66]. Mezi novější metody, které umožnily analýzu pevných vzorků, jako jsou tablety či papírové povrchy, patří například přímá analýza v reálném čase (DART) [74] nebo desorpční ionizace pomocí elektrospreje (DESI) [75].

2.3.2 ZÁKLADNÍ KONCEPT HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MA)LDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie (MS) je značně rozšířená metoda pro kvalitativní analýzu neznámých látek a funguje na principu rozdělení nabitých částic dle jejich hmotností v elektrickém či magnetickém poli. V první fázi dochází k ionizaci (tvorbě iontů) a filtraci iontů hmotnostní analýzou. Poté probíhá měření četnosti iontů v závislosti na hodnotě m/z , kdy m představuje relativní molekulovou hmotnost vzniklého iontu a z počet nábojů vzniklého iontu (nabývá hodnot 1, 2, 3, 4, ...). V konečné fázi dochází k tvorbě hmotnostního spektra složeného z osy x , které přísluší hodnoty m/z a osy y , kde lze odečítat intenzitu signálu (četnost iontů). Hmotnostní spektrometr detekuje závislost intenzity iontů (a. i.) na měrném náboji (m/z). Pro snadnější identifikaci iontů se začal využívat přepočet na jednotkový náboj $z = 1$, což umožňuje používání matrice, která v sumárních vzorcích molekul analytů poskytuje značnou výhodu a dává možnost využívat bezrozměrnou veličinu průměrné relativní hmotnosti M_r^{st} pro interpretaci spekter. Jelikož jsou molekuly měřeny v pozitivním či negativním módu (kladné či záporné excitační napětí), dochází z hlediska polarity ke vzniku kladně nabitých nebo záporně nabitých jednomocných iontů. Při měření v pozitivním módu přístroje jsou proto detekovány pouze kationty $[M_r+H]^+$ a v negativním módu anionty $[M_r-H]^-$.

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí: iontový zdroj, analyzátor a detektor. Aby mohlo dojít ke vzniku iontů, je třeba využít buď měkkých ionizačních technik, které se využívají pro studium širokého spektra látek, jako jsou proteiny, peptidy, sacharidy či syntetické polymery, nebo tvrdých ionizačních technik, které mají uplatnění při analýze malých organických molekul (elektronová ionizace – EI, indukčně vázaná plazma – ICP, laserová desorpce – LD). Nevýhodou tvrdých technik je, že dochází vlivem velkého přebytku energie ke fragmentaci.

Laserová desorpční hmotnostní spektrometrie (LDMS) v základě využívá dvě ionizační techniky: LDI (laser desorption/ionisation), což je přímá laserová desorpce a ionizace z povrchu vzorku a MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization), kde se jedná o laserovou desorpci a ionizaci za přítomnosti matrice – roztok matrice smíchané s analytem se nanese na měřicí destičku a po odpaření rozpouštědel zde zůstává vykrytalizovaná matrice s molekulami analytu [76]. Matrice jsou látky, které mají krystalické molekuly a nejčastěji se využívá 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB), α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina a 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina (sinapová kyselina). Z těchto matric se následně připravuje roztok ve směsi organických

rozpouštědel jako je ethanol či acetonitril spolu s destilovanou vodou a někdy za použití trifluoroctové kyseliny. Matrice mají tu výhodu, že mají relativně nízkou molekulovou hmotnost, mívají kyselé pH, které působí jako protonové zdroje podporující ionizaci analyzovaného vzorku, kdy předávají energii laseru vzorku a pomáhají tak s jeho šetrnou ionizací. A to vše díky své schopnosti absorbovat v ultrafialové či infračervené oblasti spektra, což souvisí s jejich chemickou strukturou obsahující konjugované dvojné vazby.

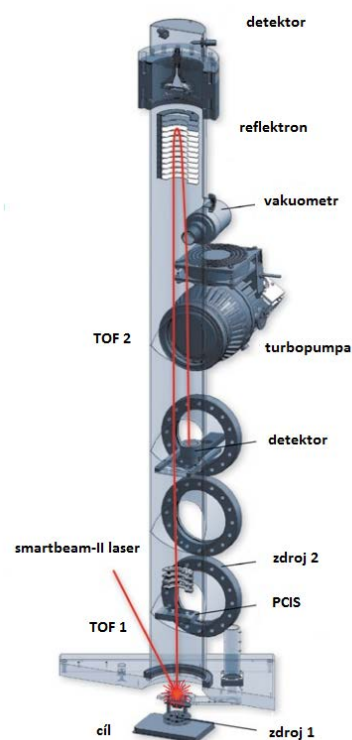
Hmotnostní analyzátoři fungují na dvou různých principech. Prvním z nich je přítomnost magnetického pole, kdy dochází k oddělení iontů o stejném m/z , které následně proletí kvadrupólovým analyzátořem. Druhý princip využívají TOF analyzátoři (time of flight), kde jsou ionty urychlovány vysokým napětím v rozmezí 25–30 kV. Díky tomuto vysokému napětí ionty získají stejnou kinetickou energii, kterou lze zapsat následovně (rovnice 2), kde E_k [J] je kinetická energie, m [kg] je hmotnost, v [m/s] je rychlost částice, s [m] je délka letu a t [s] je čas doby letu:

$$E_k = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2, \quad kde \ v = \frac{s}{t} \quad [2]$$

Urychlené ionty vstoupí přes uzemněnou mřížku do trubice s vakuem, ve které mají takové rychlosti, které jsou dány jejich hmotnostmi a nábojem (v případě MALDI jednotkovým). Doba letu proto závisí pouze na poměru molekulové hmotnosti a eventuálně náboji částice.

TOF analyzátoři mají hned několik výhod, mezi něž patří poměrně krátká doba analýzy, vysoká citlivost a vysoká maximální hodnota m/z . Tyto analyzátoři mohou pracovat lineárně, což je vhodné pro velké molekuly, nebo reflektorově (obr. 18) pro vyšší rozlišení u menších molekul.

Reflektory neboli tzv. iontová zrcadla se skládají z prstencových elektrod na konci letové trubice, ke kterým je přiváděno napětí o stejné hodnotě polarit, jako bylo použito u iontové extrakce. Hlouběji do opačně orientovaného elektrického pole



Obrázek 18: Schéma funkce reflektorového analyzátoru TOF-TOF (zdroj: bruker.com)

reflektoru vlétají ionty o vyšší kinetické energii a jsou tak opoždovány oproti iontům s energií nižší. Tím se zvyšují rozdíly v době strávené v letové trubici, neboli se zvyšují rozdíly v detektorem zaznamenávané době letu různě hmotných iontů.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB), Sigma
- acetonitril (ACN), Fluka
- cyklohexan, Lach-ner (ČR)
- diethylether, PENTA (ČR)
- ethanol, PENTA (ČR)
- chloroform, Lach-ner (ČR)
- pepmix (Bruker Daltonics, Německo)
- trifluoroctová kyselina (TFA), Sigma

- Roztok matrice pro měření pomocí MALDI-TOF MS: 10 mg DHB bylo rozpuštěno v roztoku obsahujícím 150 μ l ACN, 250 μ l 0,2% TFA a 100 μ l destilované vody

3.2 ANALYZOVANÉ VZORKY

- FRONTLINE Combo[®] Spot On Cat, Merial; 0,50 ml
 - Butylhydroxyanisol (M_r 180,24); 0,10 mg
 - Butylhydroxytoluen (M_r 220,35); 0,05 mg
 - Ethanol (M_r 46,07); 39,5 mg
 - Fipronil (M_r 437,15); 50 mg
 - (S)-methopren (M_r 310,50); 60 mg
- FRONTLINE[®] Spot On Dog S, Merial; 0,67 ml
 - Butylhydroxyanisol (M_r 180,24); 0,134 mg
 - Butylhydroxytoluen (M_r 220,35); 0,067 mg
 - Ethanol (M_r 46,07) 0,067 ml
 - Fipronil (M_r 437,15); 67 mg
- Kiltix antiparazitní obojek, Bayer 38 cm
 - Flumethrin (M_r 510,38); 1,013 g
 - Propoxur (M_r 209,24); 4,5 g
- TOP Spot on Stronger Dog S, Bioveta 1 ml
 - Butylhydroxyanisol (M_r 180,24); 0,2 mg

Butylhydroxytoluen (M_r 220,35); 0,1 mg
Butylparaben (M_r 194,23); 1 mg
Diethylenglykolmonoethylether (M_r 134,18); 125 mg
Permethrin (M_r 391,28); 65 mg
Propylenglykol lauricum ad 1 ml

3.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

- Analytické váhy HR-60-EC (A&D Instruments, Japonsko)
- Centrifuga (Fisher, Německo)
- Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Německo)
- Třepačka MS2 minishaker (IKA, USA)
- Ultrazvuková lázeň 2510E-MT (Branson Ultrasonic, Velká Británie)

3.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ

Při první sérii měření byly vzorky měřeny metodou LDI-TOF MS, tudíž bez přítomnosti matrice, jelikož se jedná o jednoduchou a časově nenáročnou analytickou metodu nevyžadující takřka žádnou přípravu vzorků. Molekuly analyzované látky jsou v kapalně nebo pevné fázi za sníženého tlaku ionisovány a desobovány laserem přímo z povrchu měřicí ocelové destičky.

Na měřicí destičku (tabulka I) bylo samostatně nanášeno 0,1 μ l vzorků FRONTLINE® Spot On Dog S, FRONTLINE Combo® Spot On Cat, TOP Spot on Stronger Dog S a přibližně několik mikrogramů prášku seškrábaného z Kiltix antiparazitního obojku. Dále byly na jednotlivé spoty nanесeny vzorky roztoků FRONTLINE® Spot On Dog S v roztoku s vodou a s chloroformem. To samé bylo provedeno i s přípravky FRONTLINE Combo® Spot On Cat a TOP Spot on Stronger Dog S. Vzorek prášku z Kiltix antiparazitního obojku byl navážen dvakrát po 15 mg, přičemž jeden vzorek byl smíchán s 200 μ l vody a druhý s 200 μ l chloroformu. Oba vzorky byly následně umístěny po dobu jedné minuty na třepačku a po dobu 5 minut do centrifugy. Výsledné odebrané roztoky byly též aplikovány na jednotlivé spoty.

Tabulka I: Příprava vzorků pro měření bez přítomnosti DHB matrice

<i>Přípravek</i>	<i>Množství přípravku</i>	<i>Rozpouštědlo (μl)</i>	
		voda	chloroform
<i>Frontline</i>	0,5 μl	0,5	2,5
<i>Frontline Combo</i>	0,5 μl	0,5	2,5
<i>Top Spot On</i>	0,5 μl	0,5	2,5
<i>Kiltix</i>	15 mg	200,0	200,0

Během druhé série měření byly veškeré vzorky měřeny metodou MALDI-TOF MS (FRONTLINE® Spot On Dog S, FRONTLINE Combo® Spot On Cat, TOP Spot on Stronger Dog S) nanášeny spolu s roztokem matrice DHB (tabulka II). Vzorek prášku z Kiltix antiparazitního obojku byl navážen čtyřikrát po 15 mg, smíchán s 5 μl DHB a jednotlivě po 50 μl s následujícími rozpouštědly: vodou, ethanolem, diethyletherem a hexanem. Vzorky byly dále podrobeny 10 minutové sonikaci a následně byly na 5 minut umístěny do stolní centrifugy. Výsledné odebrané roztoky byly též aplikovány na jednotlivé spoty.

Tabulka II: Příprava vzorků pro měření s DHB matricí

Přípravek	Množství přípravku	Množství DHB (μl)	Rozpouštědlo (μl)			
			voda	ethanol	diethylether	cyklohexan
<i>Frontline</i>	0,5 μl	5,0	-	-	-	-
<i>Frontline Combo</i>	0,5 μl	5,0	-	-	-	-
<i>Top Spot On</i>	0,5 μl	5,0	-	-	-	-
<i>Kiltix</i>	15 mg	5,0	50,0	50,0	50,0	50,0

3.5 ANALÝZA POMOCÍ (MA)LDI-TOF MS

Připravené vzorky insekticidních přípravků (dle série měření) byly nanášeny na měřicí destičku, kde se následně nechaly vykrystalizovat. Měření probíhalo na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Německo), vybaveným 1 kHz Smartbeam laserem. K získání spekter byl použit software

flexControl. Spektra byla zaznamenána v pozitivním i negativním reflektorovém módu s hmotnostním rozmezím 80–780 Da při prvním měření a 180–1000 Da při měření s DHB za maximální frekvence laseru. Pro každý vzorek byla sečtena spektra získaná z 500 pulzů laseru v 50-pulzových krocích na osmi různých pozicích jediného spotu, na kterém byl nanesen vzorek. Přístroj byl kalibrován na komerční směs Pepmix, bylo tedy potřeba při vyhodnocování spekter počítat s přesností měření hmotnostního spektrometru $\pm 0,8$ Da (tabulka III) a také bylo třeba brát v úvahu izotopovou distribuci.

Všechna hmotnostní spektra, která měří závislost intenzity iontů (a. i.) na měrném náboji (m/z) iontů analyzované látky, byla vyhodnocována pomocí softwaru mMass (verze 5.5.0) [77].

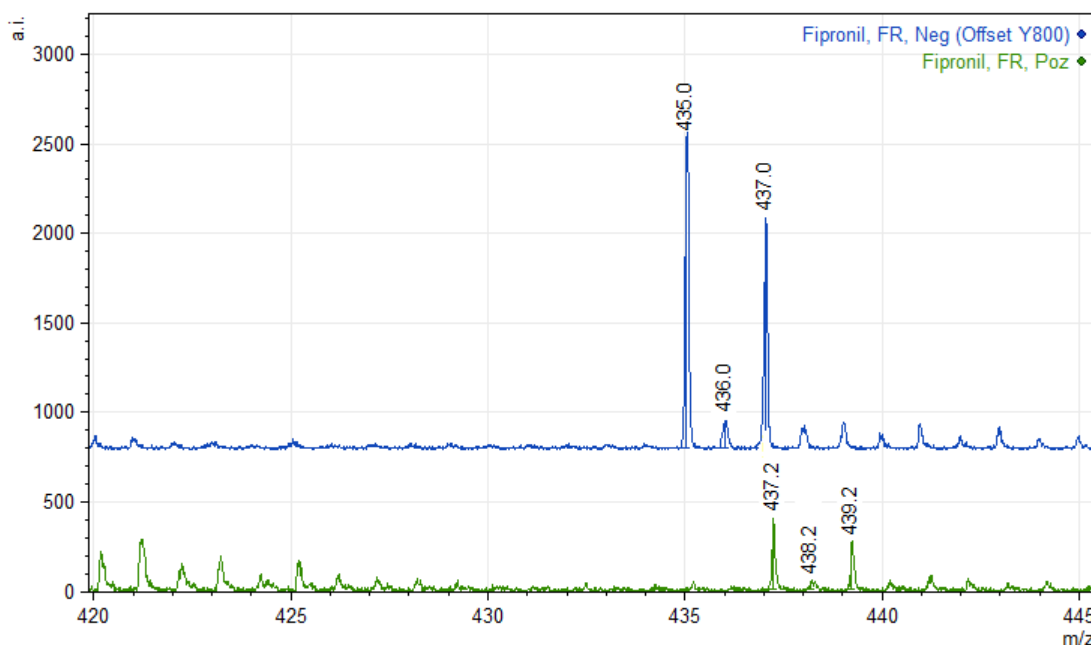
Tabulka III: Hledané hodnoty molekulových píků v rámci chyby měření $\pm 0,8$ Da

Insekticid	M_r	m/z molekulového iontu v daném reflektorovém módu		Rozsah m/z hledaných molekulových iontů
<i>Fipronil</i>	437,15	+	438,1	437,3–438,9
		-	436,1	435,3–436,9
<i>Methopren</i>	310,5	+	311,5	310,7–312,3
		-	309,5	308,7–310,3
<i>Permethrin</i>	391,28	+	390,2	389,4–391,0
		-	392,2	391,4–393,0
<i>Propoxur</i>	209,24	+	210,2	209,4–211,0
		-	208,2	207,4–209,0
<i>Flumethrin</i>	510,38	+	511,3	510,5–512,1
		-	509,3	508,5–510,1

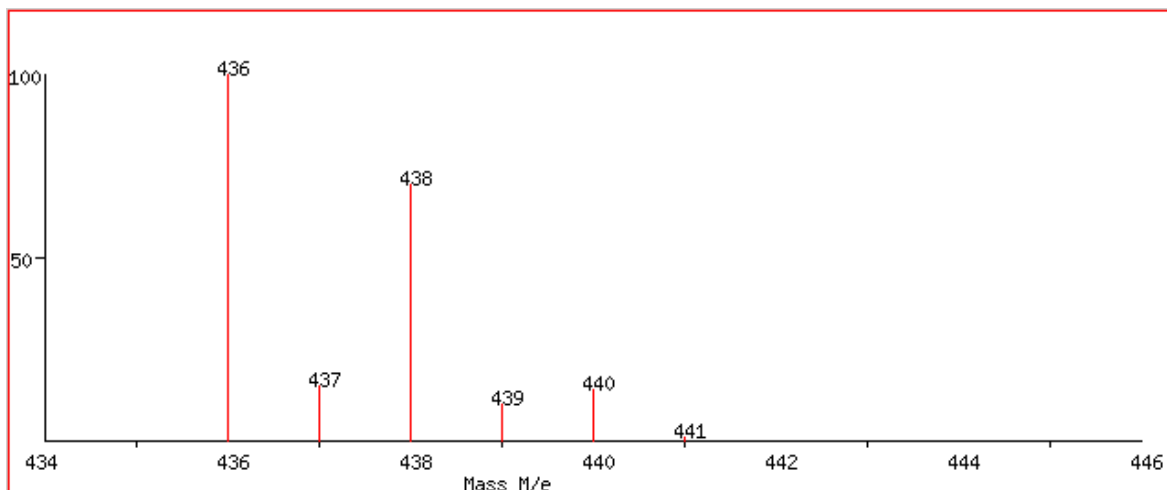
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 FIPRONIL

Experimentálně bylo zjištěno, že fipronil lze identifikovat dle jeho molekulové hmotnosti (M_r 437,15) v hmotnostních spektrech v obou přípravcích FRONTLINE® Spot On Dog S a FRONTLINE Combo® Spot On Cat. Základní pík molekulového iontu lze nalézt jak v pozitivním, kdy jsou měřeny kationty $[M_r+H]^+$, tak i v negativním reflektorovém módu, kdy jsou sledovány anionty $[M_r-H]^-$ (obr. 19). Píky se nacházejí zpravidla ve skupině dvou až tří izotopů s nejsilnějším signálem o daných posunech (+1 pro pozitivní a -1 pro v negativní mód) vůči molekulovým hmotnostem izotopů fipronilu: 435,9; 436,9; 437,9; 438,9; 439,9. Izotopová distribuce nenabitých molekulových iontů byla vypočtena pomocí izotopové distribuční kalkulačky (isotope distribution calculator and mass spec plotter) [78] (obr. 20). S přihlédnutím k chybě měření $\pm 0,8$ Da, je chyba u negativního módu pouze +0,1 Da (měřené hodnoty 435,0; 436,0 a 437,0) a v případě pozitivního módu +0,3 Da (měřené hodnoty 437,2; 438,2 a 439,2). Pro identifikaci fipronilu se tedy ukázal jako vhodný jak negativní, tak i pozitivní mód.



Obrázek 19: Hmotnostní spektrum fipronilu v přípravku Frontline v pozitivním (zelené spektrum) a negativním (modré spektrum) reflektorovém módu bez DHB matrice

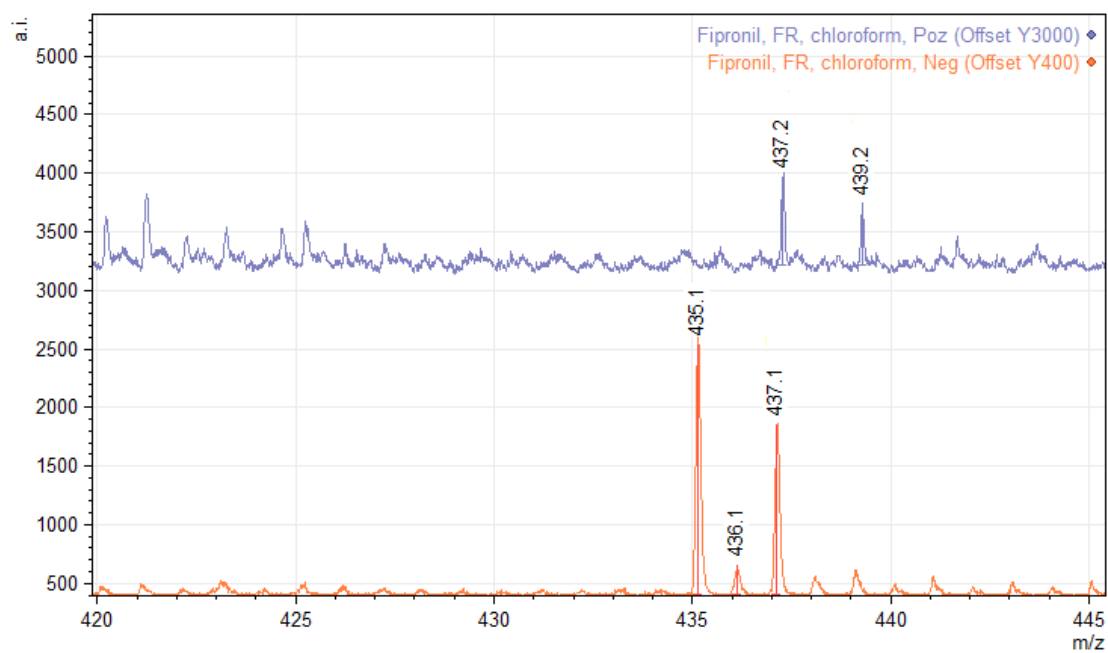


Obrázek 20: Distribuce izotopů ve fipronilu (435,9; 436,9; 437,9; 438,9; 439,9; 440,9; 441,9)

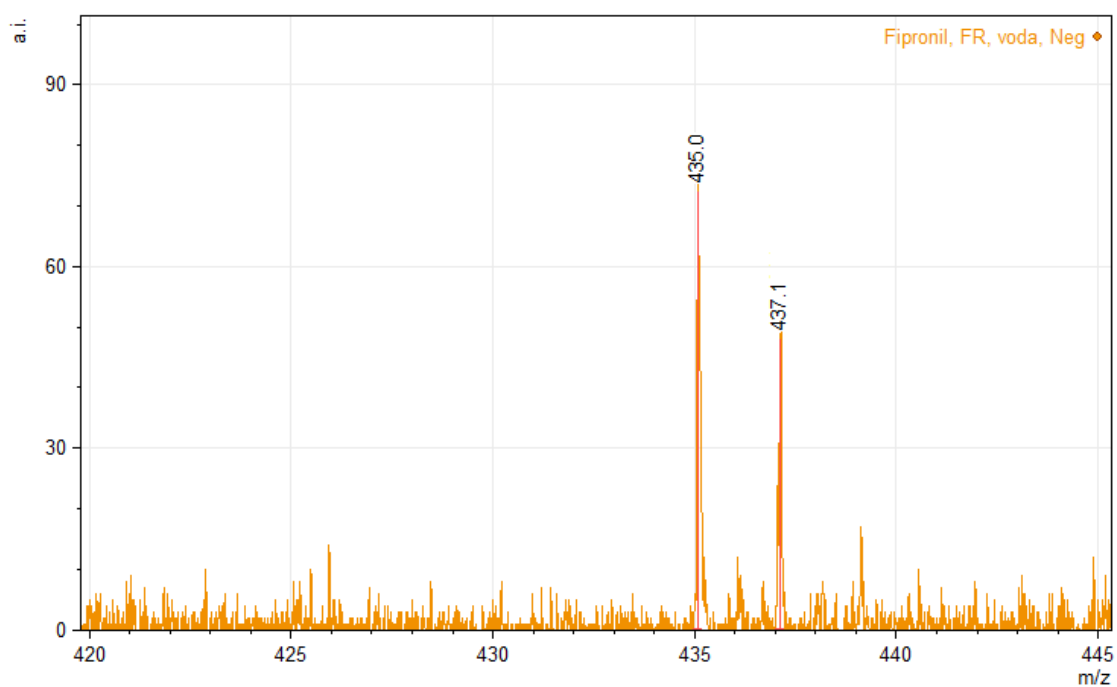
Jak již bylo uvedeno, fipronil lze identifikovat i v přípravku FRONTLINE® Spot On Dog S v obou módech (obr. 19), přičemž v čistém stavu lze molekulový pík najít v negativním módu v izotopovém zastoupení o hodnotě 435,0; 436,0; 437,0 m/z a v pozitivním módu v oblastech 437,2; 438,2; 439,2 m/z . Obdobně se podařilo fipronil nalézt v obou módech i v roztoku s chloroformem (obr. 21). V roztoku s vodou (obr. 22) bylo možné identifikovat píky pouze v negativním módu s hodnotou 435,0; 437,1 m/z . Tato skutečnost je pravděpodobně dána nízkou rozpustností látky ve vodě (tabulka IV) a tudíž nízkou koncentrací fipronilu v konečném analyzovaném roztoku.

Tabulka IV: Rozpustnost ve vodě daných insekticidů

<i>Insekticid</i>	<i>Rozpustnost ve vodě</i>
<i>Fipronil</i>	1,9 mg/l pro pH 5 a 2,4 mg/l pro pH 9 při 20 °C
<i>Methopren</i>	1,39 mg/l za pokojové teploty
<i>Permethrin</i>	5,5 µg/l
<i>Propoxur</i>	0,2 g na 100 ml (0,2 %) při 20 °C.
<i>Flumethrin</i>	200 mg/l při 20 °C

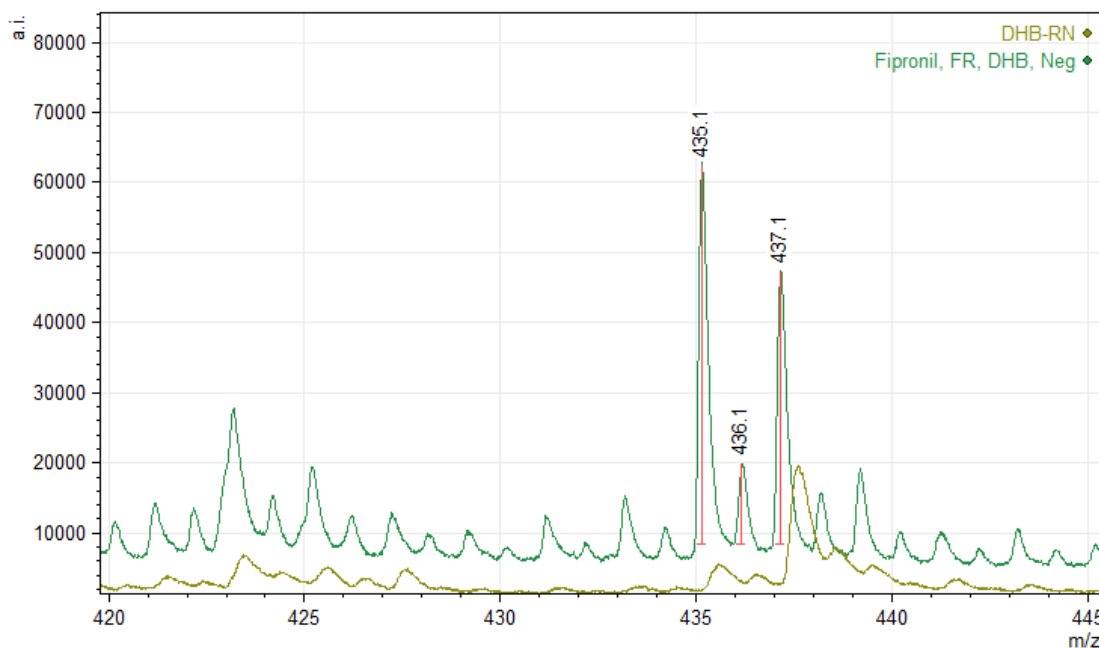


Obrázek 21: Hmotnostní spektrum fipronilu v přípravku Frontline v chloroformu v pozitivním (fialové spektrum) a negativním (oranžové spektrum) reflektorovém módu bez DHB matrice



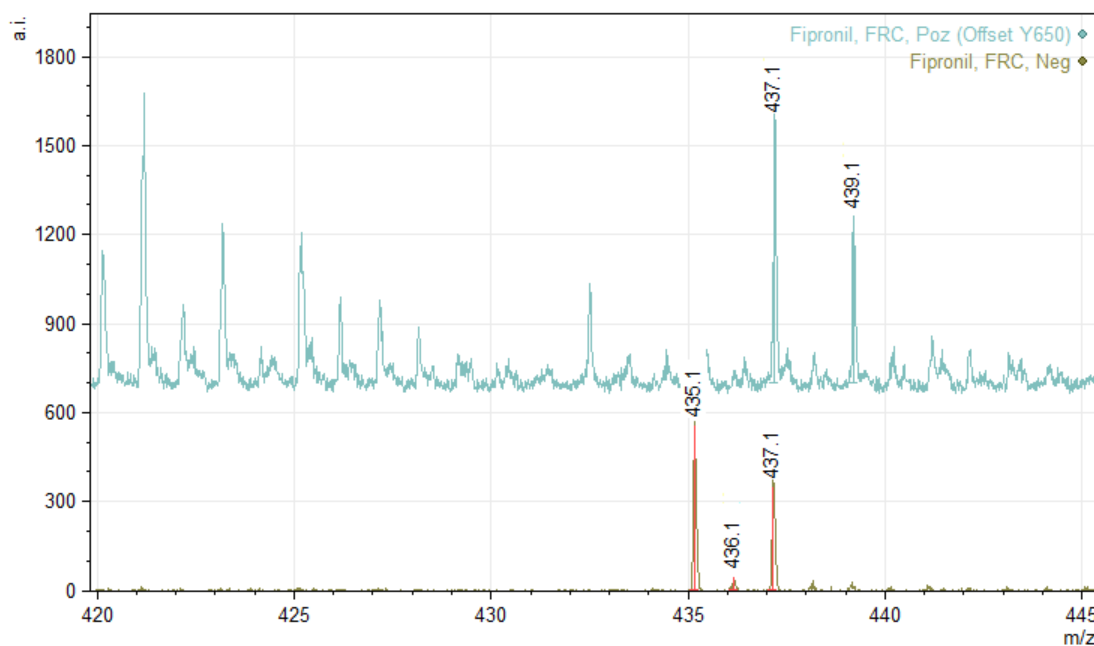
Obrázek 22: Hmotnostní spektrum fipronilu v přípravku Frontline ve vodě změřené v negativním reflektorovém módu bez přítomnosti DHB matrice

V případě analýzy samotného vzorku FRONTLINE® Spot On Dog S za přítomnosti DHB matrice (obr. 23) lze příslušné izotopy nalézt pouze v negativním módu o hodnotách 435,1; 436,1 a 437,1 m/z .



Obrázek 23: Hmotnostní spektrum fipronilu v přípravku Frontline v negativním reflektorovém módu (zelené spektrum) s DHB matricí (khaki spektrum)

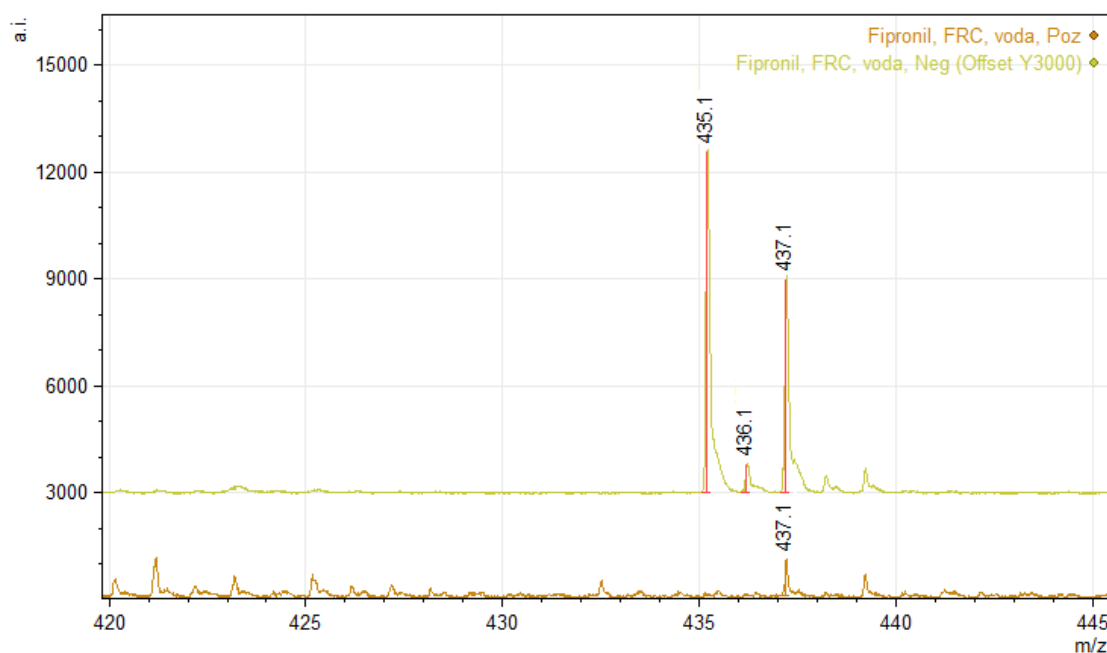
V přípravku FRONTLINE Combo® Spot On Cat byl v přítomnosti DHB matrice fipronil identifikován také v obou módech (obr. 24). Ve spektru jej lze identifikovat podle izotopových hodnot 435,1; 436,1 a 437,1 m/z u negativního módu a 437,1 a 439,1 m/z u pozitivního módu.



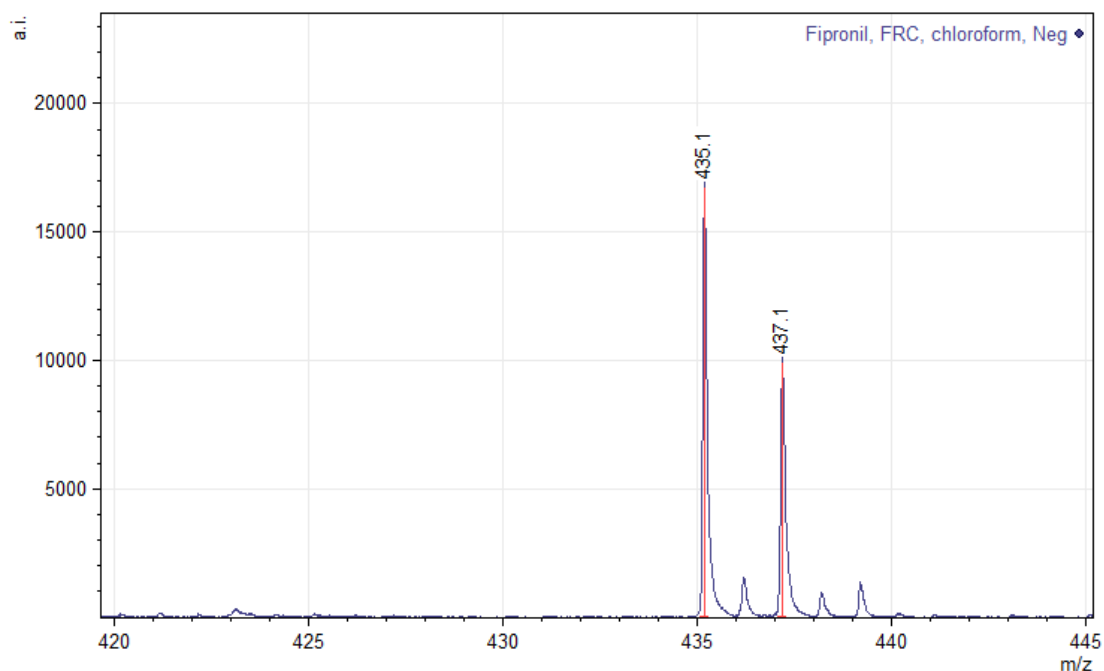
Obrázek 24: Hmotnostní spektrum fipronilu v přípravku Frontline Combo v pozitivním (modré spektrum) a negativním (khaki spektrum) reflektorovém módu bez DHB matrice

Ve spektru roztoku FRONTLINE Combo[®] Spot On Cat smíchaného s vodou (obr. 25) bylo možné identifikovat izotopy fipronilu v negativním módu v oblasti 435,1; 436,1; 437,1 m/z a v pozitivním módu v oblasti 437,1 m/z , na rozdíl od předchozího přípravku určeného pro psy. Nicméně i přesto (při zachování jinak stejného přístrojového nastavení) je intenzita nalezeného píku u pozitivního módu podstatně nižší. Stejný přípravek v roztoku s chloroformem (obr. 26) umožnil identifikovat fipronil v izotopových hodnotách 435,1 a 437,1 m/z pouze v negativním módu.

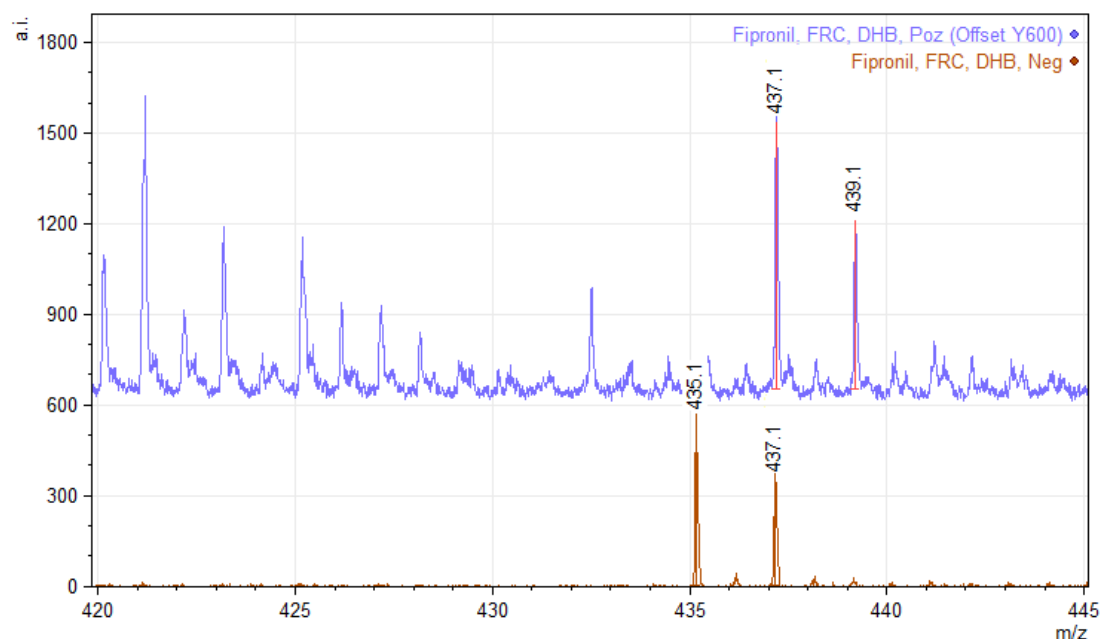
U měření s DHB matricí byly izotopové píky zjištěny v obou módech v hodnotách 435,1 a 437,1 m/z u negativního módu a 437,1 a 439,1 m/z u pozitivního módu (obr. 27).



Obrázek 25: Hmotnostní spektrum fipronilu v přípravku Frontline Combo ve vodě v pozitivním (oranžové spektrum) a negativním (zelené spektrum) reflektorovém módu bez DHB matrice



Obrázek 26: Hmotnostní spektrum fipronilu v přípravku Frontline Combo v chloroformu v negativním reflektorovém módu bez DHB matrice



Obrázek 27: Hmotnostní spektrum fipronilu v přípravku Frontline Combo v negativním (tmavě oranžové spektrum) a pozitivním (fialové spektrum) reflektorovém módu s DHB matricí

Při zkoumání naměřených hmotnostních spekter byly vyhledávány i fragmentační ionty na základě později dohledaných hmotnostních spekter látek z databáze New Jersey department of environmental protection, Pesticide control program's laboratory [79].

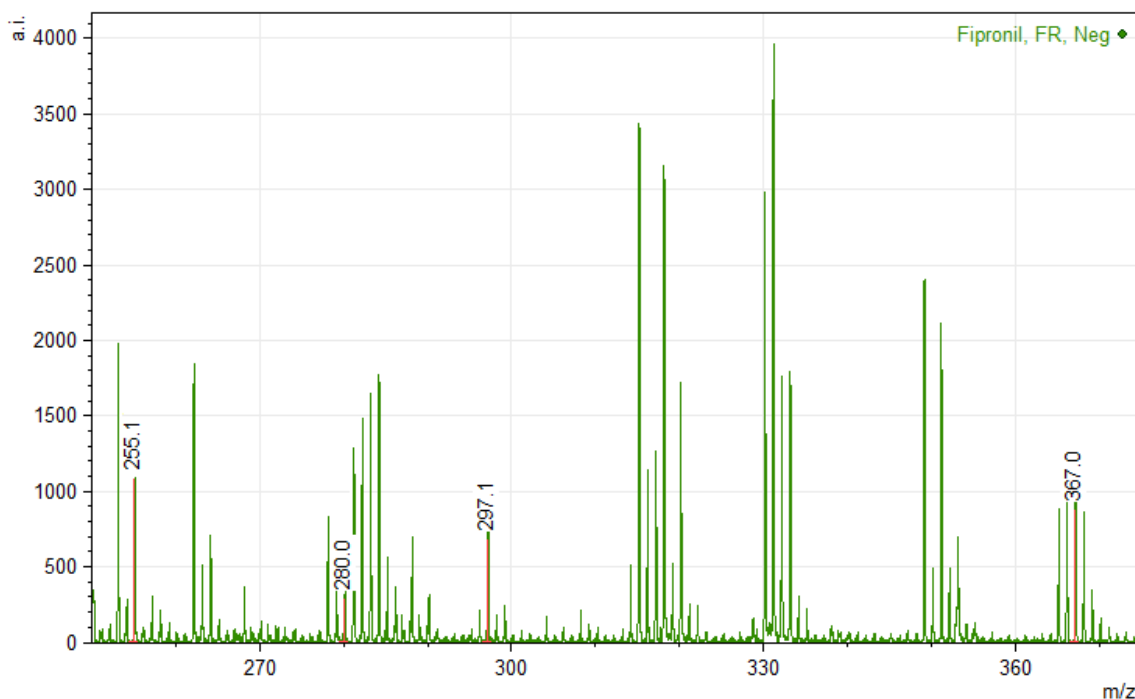
Jednotlivé fragmentační ionty získané technikou EI, která poskytuje kladně nabitě částice $[M+H]^+$, jsou uvedeny v tabulce V.

Tabulka V: Naměřené hodnoty pro jednotlivé insekticidy bez DHB matrice (EI = elektronová ionizace, desetinná místa u fragmentačních iontů nejsou uváděna z důvodu vyčtení hodnot s obrázku hmotnostního spektra dle zmíněných zdrojů)

Insekticid (přípravek)	M_r		Molekulový iont (m/z)		Hlavní fragmentační ionty (m/z) EI $[M+H]^+$	Fragmentační ionty z (MA)LDI spekter (m/z) $[M-H]^+$
			$[M_r+H]^+$	$[M_r-H]^-$		
<i>Fipronil</i> (Frontline (Fr) a Frontlone Combo (FrC))	437,15	Fr	437,2; 437,2; 438,2; 439,2	435,0; 435,0; 435,1; 436,0; 436,1; 437,0; 437,1	45, 77, 109, 126, 143, 161, 178, 196, 213, 230, 255, 280, 297, 324, 348, 367, 403, 420, 438	255,1; 280,0; 297,1; 367,0
		FrC	437,1; 439,1	435,1; 435,1; 435,1; 436,1; 436,1; 437,1; 437,1		255,1; 367,1
<i>Methopren</i> (Frontline Combo)	310,50		310,5 (?)	-	41, 42, 43, 53, 55, 57, 59, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 77, 79, 81, 83, 85, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 105, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 133, 135, 136, 137, 147, 149, 153, 155, 156, 161, 164, 165, 175, 176, 179, 189, 191, 193, 203, 219, 221, 235, 250, 251, 263, 278, 295	-
<i>Permethrin</i> (Top Spot On Stronger)	391,28		-	-	39, 41, 51, 63, 65, 77, 78, 89, 90, 91, 115, 127, 128, 129, 152, 153, 154, 155, 163, 164, 165, 167, 168, 181, 183, 184	183,2 (voda)
<i>Propoxur</i> (Kiltix)	209,24		210,4	209,2	27, 39, 41, 43, 51, 52, 53, 54, 63, 64, 65, 81, 82, 92, 110, 111	-
<i>Flumethrin</i> (Kiltix)	510,38		-	-	data nenalezena	-

U samotného přípravku FRONTLINE® Spot On Dog S byly nalezeny v negativním módu (obr. 28) fragmentační ionty v oblastech 255,1; 280,0; 297,1 a 367,0 m/z . Řada dalších píků nejspíše přísluší iontům ostatních přítomných látek obsažených v přípravku. U FRONTLINE Combo® Spot On Cat byly v negativním módu nalezeny hodnoty v oblasti 255,1 a 367,1 m/z . Pravděpodobně se tedy jedná o hledané fragmentační ionty náležící fipronilu. Bohužel nejsou k dispozici naměřená spektra pod hodnotu 200 m/z , jelikož se práce primárně zaměřuje na identifikaci molekulových píků.

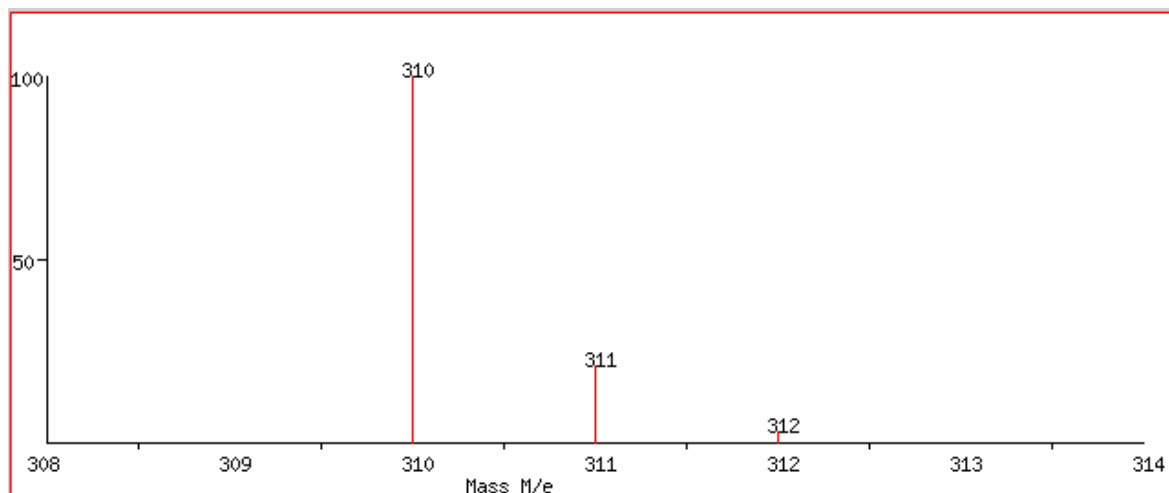
V případě obou přípravků měřených v přítomnosti DHB matrice nelze v hmotnostních spektrech fragmentační ionty dohledat.



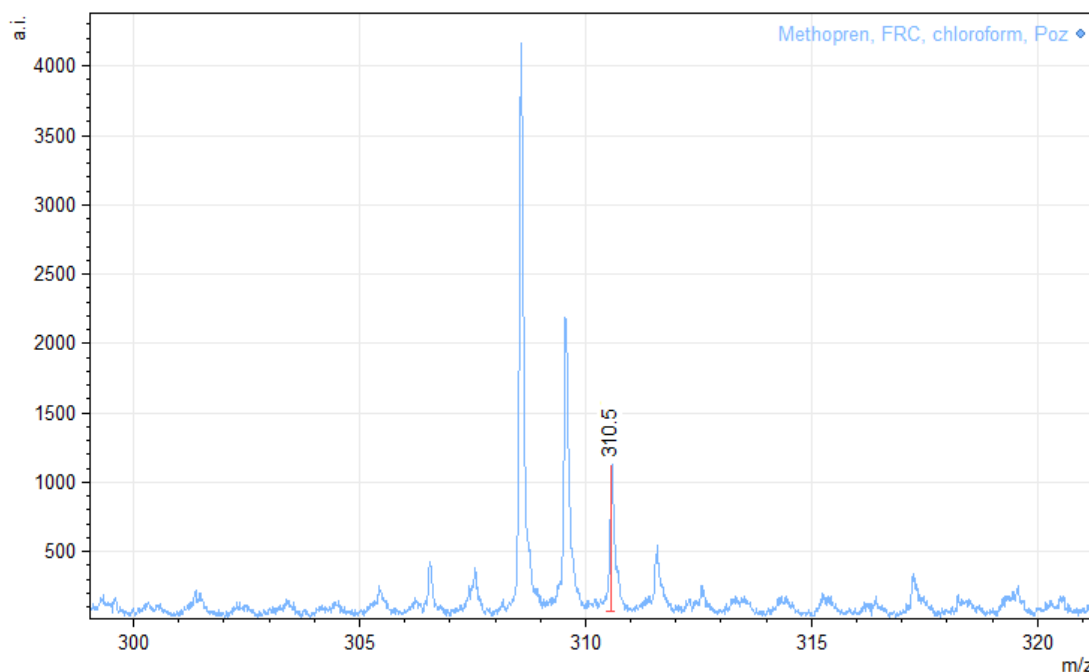
Obrázek 28: Hmotnostní spektrum s fragmentačními ionty fipronilu v přípravku Frontline v negativním reflektorovém módu bez DHB matrice

4.2 METHOPREN

U methoprenu (M_r 310,50) lze dle isotopové distribuční kalkulačky (obr. 29) očekávat v největším zastoupení hodnoty v oblasti 310,2; 311,2 a 312,2 m/z . V daném vzorku (FRONTLINE Combo® Spot On Cat) měřeném v čistém stavu bez DHB matrice nelze tyto hodnoty prokázat a též je není možné prokázat ani ve spektru vzorku smíchaného s vodou. V kombinaci s chloroformem bez přítomnosti DHB matrice v pozitivním módu lze nalézt pík v oblasti 310,5 m/z , přesto se vzhledem k rozložení spektra pravděpodobně nejedná o hledaný molekulový pík náležící methoprenu (obr. 30).



Obrázek 29: Distribuce izotopů v methoprenu (310,3; 311,3; 312,3)



Obrázek 30: Hmotnostní spektrum methoprenu v přípravku Frontline Combo v pozitivním reflektorovém módu bez DHB matrice

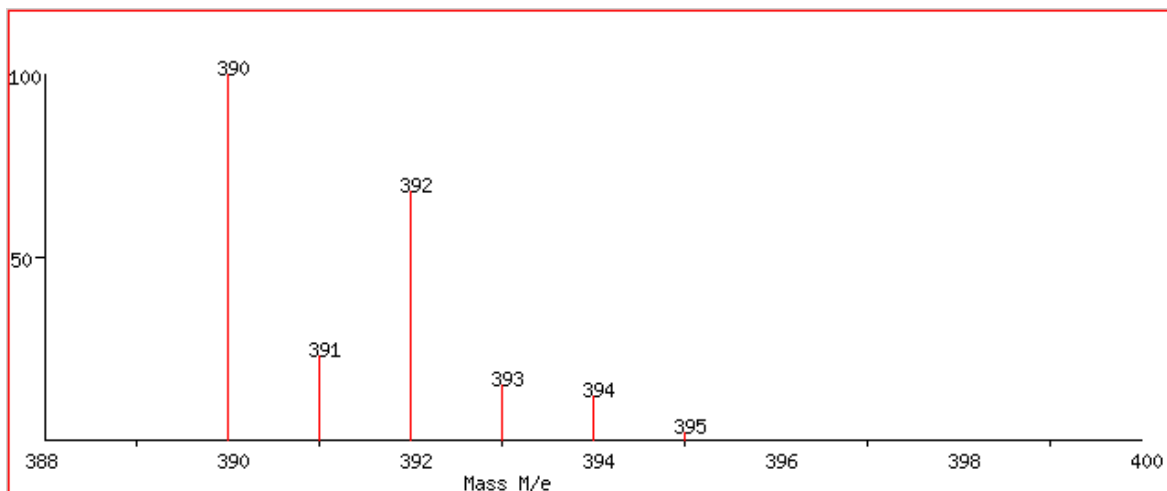
Při identifikaci molekulového iontu methoprenu v přípravku FRONTLINE Combo® Spot On Cat za přítomnosti DHB matrice nebyl nalezen základní pík v pozitivním ani negativním módu.

Při zkoumání získaných hmotnostních spekter byly i u methoprenu hledány fragmentační ionty na základě později dohledaného hmotnostního spektra látky z databáze National institute of standards and technology (NIST) [80]. Jednotlivé fragmentační ionty jsou uvedeny v tabulce V. U čistých látek ani u látek s DHB matricí nebyly v přípravku

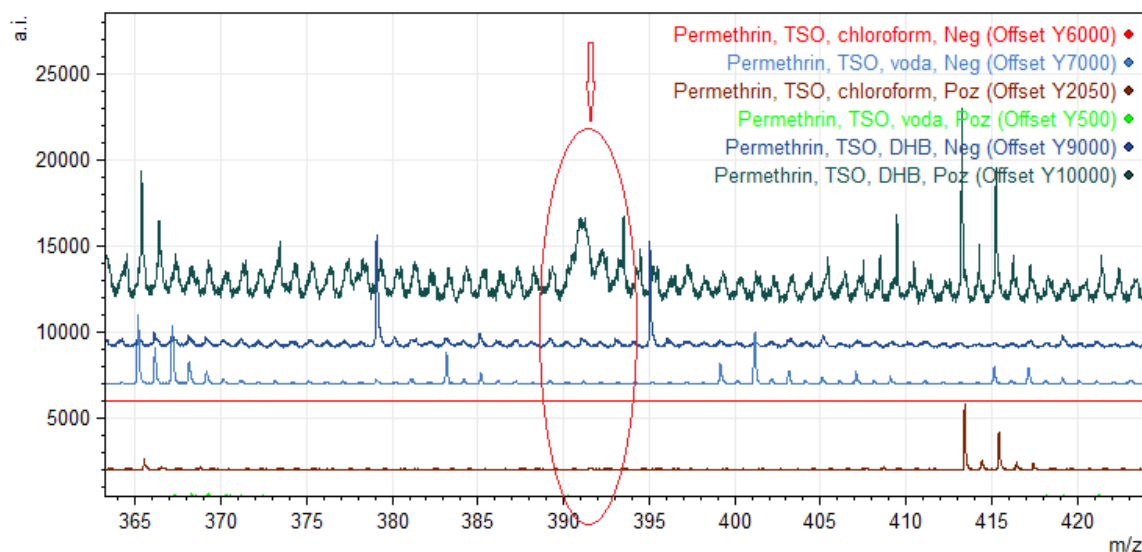
zjištěny hledané hodnoty. Tato skutečnost ale může být dána opět faktem, že nejsou k dispozici naměřená spektra pod hodnotu 200 m/z a pro methopren je nejvýraznějším fragmentačním iontem oblast 73 a 110 m/z .

4.3 PERMETHRIN

Pro permethrin (M_r 391,28) lze dle isotopové distribuční kalkulačky (obr. 31) očekávat v největším zastoupení hodnoty v oblasti 390,0; 392,0; 391,0 a 393,0 m/z . Permethrin byl analyzován v přípravku TOP Spot on Stronger Dog S a jeho molekulový iont v čistém přípravku bez DHB matrice nelze identifikovat v žádném módu. V roztoku s vodou i s chloroformem nebyly základní píky spolehlivě zjištěny ani v jednom módu (obr. 32). Stejně tak čistý přípravek spolu s DHB matricí se neprokázal jako vhodný, jelikož v žádném z módu nelze spolehlivě určit patřičné píky (obr. 32).



Obrázek 31: Distribuce izotopů v permethrinu (390,1; 391,1; 392,1; 393,1; 394,1; 395,1)

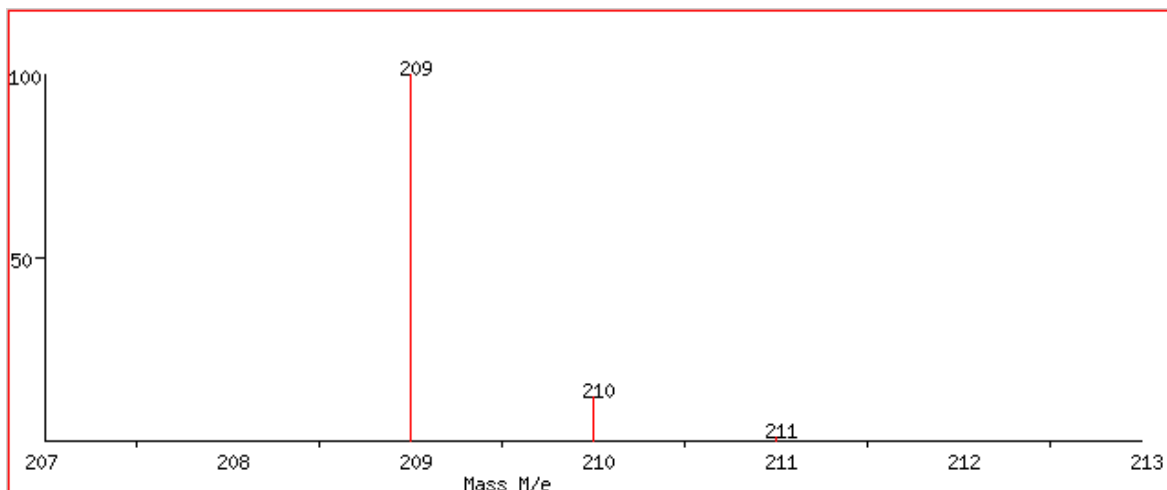


Obrázek 32: Hmotnostní spektrum permethrinu v přípravku Top Spot On – samotný (tmavě modré a tyrkysové spektrum), ve vodě (světle modré a zelené spektrum), v chloroformu (červené a hnědé spektrum) v pozitivním i negativním módu s DHB matricí i bez DHB matrice

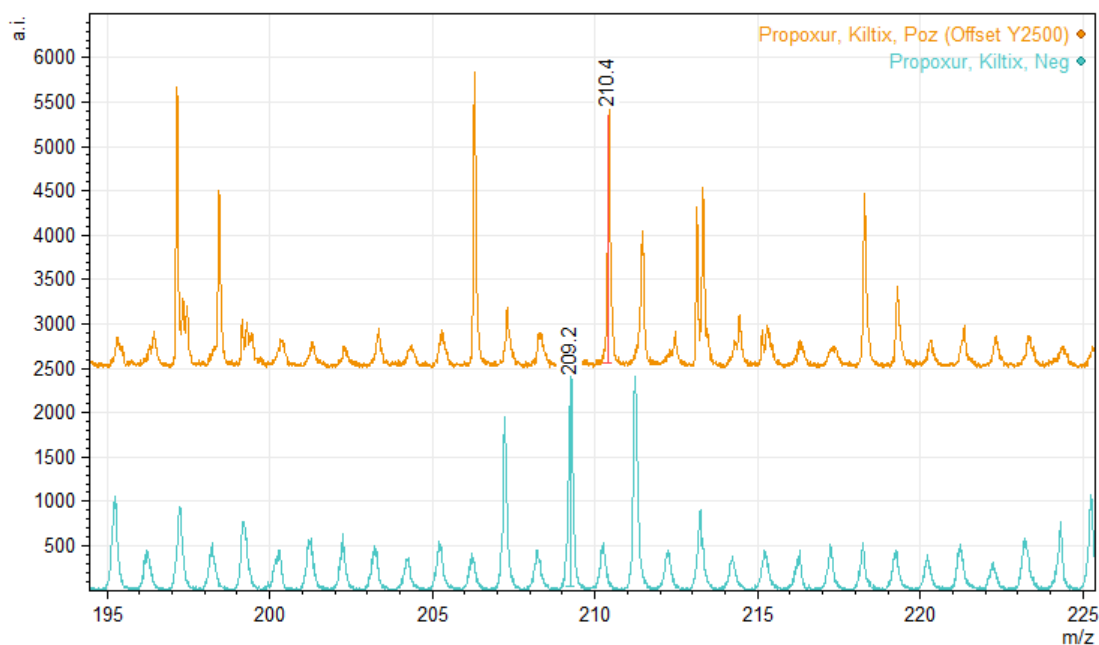
Také pro permethrin byly vyhledávány fragmentační ionty na základě později dohledaného hmotnostního spektra látky z databáze NIST [81]. Jednotlivé fragmentační ionty jsou uvedeny v tabulce V, nicméně též nebyly prokázány v žádném módu za přítomnosti DHB matrice. Ve spektru vzorku s vodou měřeného bez DHB matrice lze nalézt pouze iont u 183,2 m/z , a to v negativním módu, což ale nelze považovat za prokazatelné potvrzení přítomnosti permethrinu.

4.4 PROPOXUR

Propoxur o M_r 209,24 lze dle isotopové distribuční kalkulačky (obr. 33) vykazují izotopy v oblastech o hodnotách 209,1 a 210,1 m/z . Analýza Kiltix antiparazitního obojku ukázala, že molekulový pík propoxuru lze pravděpodobně najít v čistém přípravku v negativním módu bez DHB matrice o hodnotě 209,2 m/z a v pozitivním o hodnotě 210,4 m/z (obr. 34).

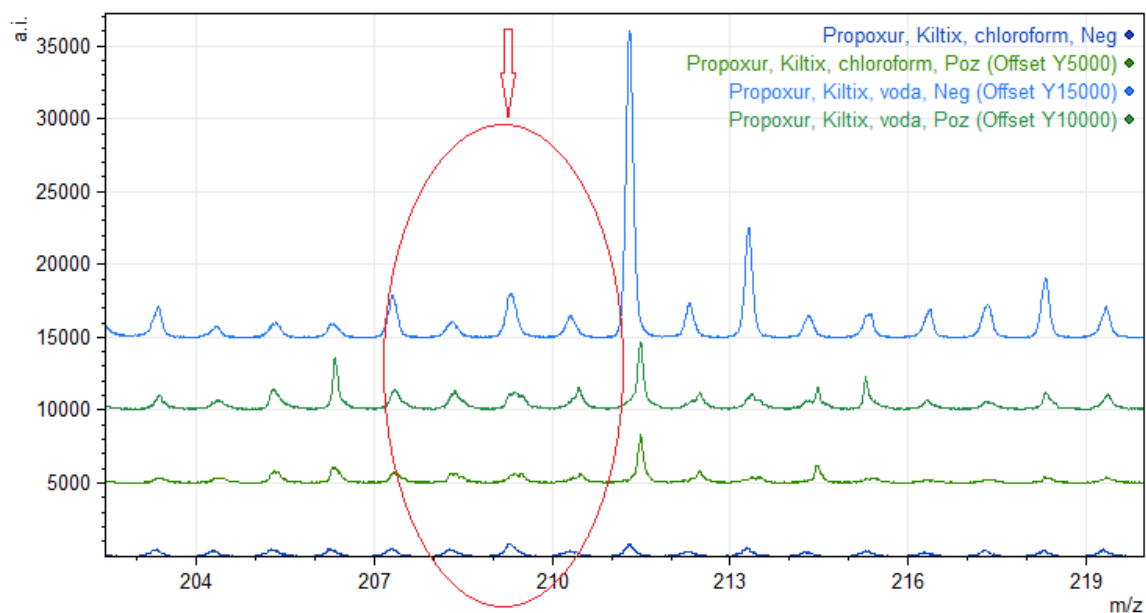


Obrázek 33: Distribuce izotopů v propoxuru (209,1; 210,1; 211,1)



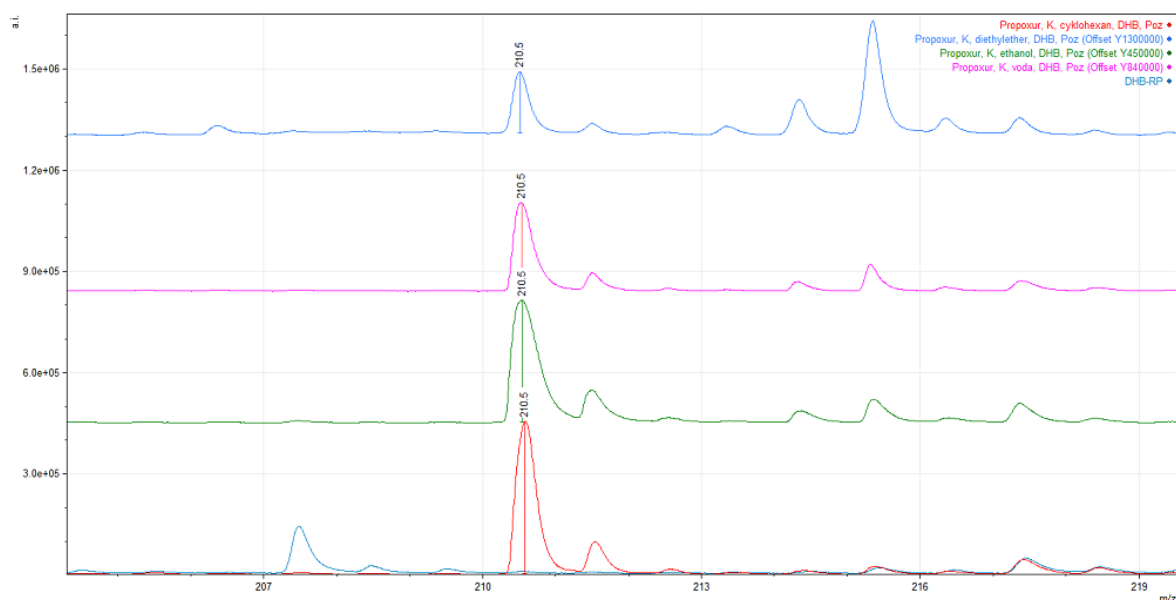
Obrázek 34: Hmotnostní spektrum propoxuru v přípravku Kiltix v pozitivním (oranžové spektrum) i negativním (modré spektrum) módu bez DHB matrice

Ve spektru z vodného i chloroformového extraktu měřeného bez matrice v pozitivním a v negativním módu (obr. 35) nebyly nalezeny hledané hodnoty m/z .



Obrázek 35: Hmotnostní spektrum propoxuru v přípravku Kiltix ve vodě (světle modré a tmavě zelené spektrum) a v chloroformu (tmavě modré a světle zelené spektrum) v pozitivním i negativním módu bez DHB matrice

Za přítomnosti DHB matrice a samotného přípravku Kiltix se podařilo prokázat molekulové píky propoxuru (210,5 m/z) pouze v pozitivním módu ve všech testovaných rozpouštědlech – diethyletheru vodě, ethanolu a cyklohexanu (obr. 36). Jako nejvhodnější rozpouštědlo se dle množství zastoupení iontů jeví cyklohexan, následován ethanolom.

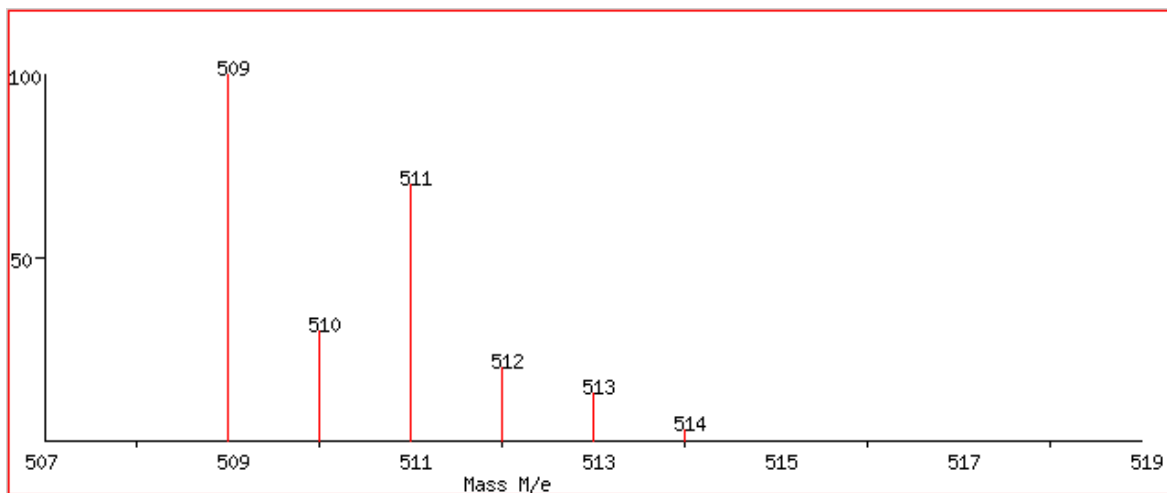


Obrázek 36: Hmotnostní spektrum propoxuru v přípravku Kiltix v rozpouštědlech – voda (růžové spektrum), diethylether (tmavě modré spektrum), ethanol (zelené spektrum), cyklohexan (červené spektrum) v pozitivním reflektorovém módu s DHB matricí (světle modré spektrum)

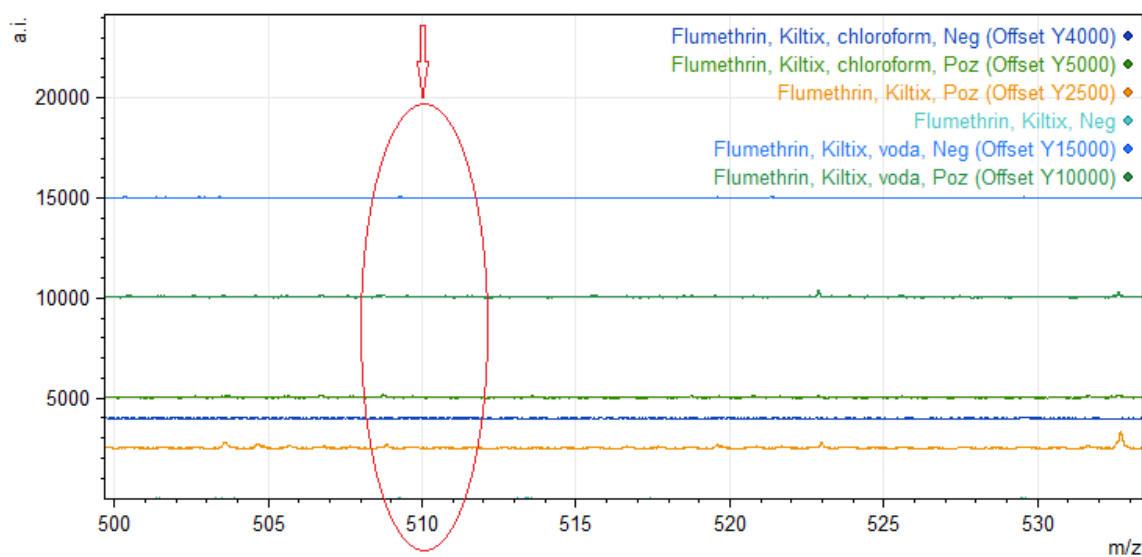
I pro propoxur byly vyhledávány fragmentační ionty na základě hmotnostního spektra látky z databáze NIST [82]. Jednotlivé fragmentační ionty jsou uvedeny v tabulce V, nicméně je nelze prokázat ve spektrech vzorku měřeného bez DHB matrice ani s její přítomností v žádném testovaném rozpouštědle. Dalším důvodem je, že nejsou k dispozici naměřená spektra pod hodnotou 200 m/z , jelikož se práce primárně zaměřuje na identifikaci molekulových píků, a fragmentační ionty propoxuru se pohybují v rozmezí 27–155 m/z , přičemž nejvýraznější je hodnota 110 m/z .

4.5 FLUMETHRIN

Bylo zjištěno, že flumethrin o M_r 510,38 lze dle isotopové distribuční kalkulačky (obr. 37) očekávat v oblastech 509,0; 510,0; 511,0; 512,0; 513,0 m/z . Avšak v Kiltix antiparazitním obojku ho není možné identifikovat bez DHB matrice v čistém stavu, s vodou ani s chloroformem v ani jednom módu (obr. 38). Také za přítomnosti DHB matrice nebylo možné prokázat molekulový pík v pozitivním ani v negativním módu v žádném typu rozpouštědla (vodě, diethyletheru, ethanolu, cyklohexanu).



Obrázek 37: Distribuce izotopů ve flumethrinu (509,1; 510,1; 511,1; 512,1; 513,1; 514,1)



Obrázek 38: Hmotnostní spektrum flumethrinu v přípravku Kiltix – samotný (tyrkysové spektrum), ve vodě (světle modré a světle zelené spektrum), v chloroformu (tmavě modré a tmavě zelené spektrum) v pozitivním i negativním reflektorovém módu bez přítomnosti DHB matrice

Pro flumethrin nebyly vyhledávány fragmentační ionty, jelikož nebyla nalezena žádná hmotnostní spektra této látky. Nemožnost identifikovat jakýmkoliv způsobem flumethrin v této práci může být dáno i jeho vyšší molekulovou hmotností (M_r 510,38) a také jeho komplikovanější strukturou oproti ostatním zkoumaným látkám. Molekula bude pravděpodobně snáze podléhat fragmentaci, než aby byla desorbována a ionizována jako celek.

5 ZÁVĚR

Vzhledem k tomu, že insekticidy patří do velmi širokého spektra různých chemických tříd, a v práci bylo vyzkoušeno kvalitativní analýzou (MA)LDI identifikovat aktivní látky ze čtyř různých chemických skupin, nedá se jednoduše říci, že metoda (MA)LDI-TOF MS je zcela nevhodná pro všechny skupiny. Přesto lze z experimentální části vyvodit závěr, že metoda by mohla být vhodná pro detekci fipronilu a propoxuru. Pro methopren, permethrin a flumethrin se však vhodnost metody nepotvrdila.

U všech látek (propoxuru, methoprenu, fipronilu a permethrinu) s výjimkou flumethrinu se podařilo nalézt hmotnostní spektra získaná ionizací pomocí elektronového nárazu, která byla dobrým odrazovým můstkem pro tuto práci a pomohla s evaluací provedených měření.

Ukázalo se, že obecně je pro detekci vybraných insekticidů vhodnější metoda LDI-TOF MS než MALDI-TOF MS, což je pravděpodobně dáno snížením koncentrace hledaných látek pod jejich detekční limit naředěním s matricí DHB. Výjimku tvoří hmotnostní spektra propoxuru, který byl takto identifikován v pozitivním reflektorovém módu ve všech typech testovaných rozpouštědel (vodě, ethanolu, diethyletheru, cyklohexanu). Také lze na základě hmotnostních spekter konstatovat, že pro fipronil je vhodnější negativní reflektorový mód, zatímco pro propoxur pozitivní reflektorový mód.

Flumethrin, methopren a permethrin se nepodařilo identifikovat žádným výše uvedeným způsobem. Tato skutečnost je pravděpodobně dána faktem, že flumethrin a permethrin pocházejí ze stejné chemické skupiny (pyrethroidů) a navíc u flumethrinu je otázkou jeho již poměrně vysoká molekulová hmotnost (pro techniku LDI). Z výše uvedeného vyplývá, že nelze stanovit jeden ucelený postup pro identifikaci insekticidů pomocí hmotnostní spektrometrie.

Z didaktického hlediska byla práce přínosná ve směru rozvinutí odborných znalostí v rámci problematiky pesticidů a provázání s globálně diskutovaným tématem životního prostředí, což dává prostor pro případné otevření odborného kroužku. Dalším přínosem je osvojení si konkrétní analytické metody a rozvinutí akademických kontaktů, které je možné využít pro navázání spolupráce v rámci odborných školních exkurzí.

Jelikož se metoda (MA)LDI-TOF MS prokázala pro methopren, permethrin a flumethrin nevhodná, pravděpodobně by bylo vhodné práci rozšířit nejprve o více různých chemických skupin a následně i v počtu zastoupení látek v rámci jedné kategorie. V nejbližší době ale bude zatím nezbytné pro identifikaci insekticidů i nadále

používat analytické metody jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie, gelová chromatografie nebo infračervená spektroskopie.

6 SEZNAM POUŽITÝCH INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

1. SEKANINOVÁ, I. Ektoparaziti psů a koček. In: *vetweb.cz* [online]. 2012 [cit. 2014-06-30]. Dostupné z: <http://vetweb.cz/ektoparaziti-psu-a-kocek/>
2. RYŠAVÝ, B., I. ZPĚVÁK a H. ZPĚVÁKOVÁ-SOKOLTOVÁ. *Základy parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989, 215 s. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). ISBN 80-042-0864-9
3. SVOBODA, M., D.F. SENIOR, J. DOUBEK a J. KLIMEŠ. *Nemoci psa a kočky*. Vyd. 2. Brno: Noviko, 2008, 1152 s. ISBN 978-808-6542-188
4. VONDŘIČKA, M. Atopie a hypersenzitivní dermatitida u psů a koček. *Veterinářství*. 2008, roč. 58, č. 10, s. 605-609.
5. HORÁČKOVÁ, K. Významní ektoparazité psa a kočky. *Praktické lékařství*. 2011, roč. 7, č. 3, s. 128-131.
6. VOLF, P. a P. HORÁK. *Paraziti a jejich biologie*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2007, 318 s. ISBN 978-807-3870-089
7. STUHLÝ, I. *Dirofilarióza se šíří do střední Evropy*. *Svět psů*. 2006, roč. 2006, č. 11, s. 46-48.
8. STUHLÝ, I. Exotické parazitózy u psů VII. *Pes přítel člověka*. 2006, č. 11, s. 12.
9. RHAJAOU, M., F. SEBTI, H. FELLAH, M.Z. ALEM, et al. Identification of the causative agent of cutaneous leishmaniasis in Chichaoua province, Morocco. *Parasite*. 2012, roč. 19, č. 1, s. 81-84.
10. FAO, *Guidelines, resistance management and integrated parasite control in ruminants*. 2004, Animal Production and Health Division, Agriculture Dept., Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome.
11. JUNQUERA, P. Parasites of Dogs, Cats & Livestock: Biology & Control. In: *parasitipedia.net* [online]. 2014 [cit. 2015-01-27]. Dostupné z: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2443&Itemid=2704
12. JUNQUERA, P. Synthetic pyrethroids for veterinary use dogs, cats and livestock - cattle, sheep, goats, pig, poultry - against external parasites. In: *parasitipedia.net* [online]. 2014 [cit. 2015-02-06]. Dostupné z: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2409&Itemid=2674

13. Česká Republika. Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů ČR*. 2007. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100075801.html>
14. WARE, G.W. a D.M. WHITACRE. *The pesticide book*. Vyd. 6. Willoughby, Ohio: MeisterPro Information Resources, A division of Meister Media Worldwide, 2004, 488 s. ISBN 1892829118
15. COLLINS, H.S. *Chemical fertilizers and parasitocides*. Vyd. 1. London: Baillière, Tindall and Cox, 1920.
16. METCALF, R.L. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Insect Control* [online]. Urbana, Illinois, United States: Department of Entomology, University of Illinois, 2000 [cit. 2015-02-12]. ISBN 9783527306732
17. JUNQUERA, P. Generic vs original veterinary antiparasitic drugs. Efficacy, safety, quality, reliability. In: *parasitipedia.net* [online]. 2015 [cit. 2015-03-02]. Dostupné z: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2795&Itemid=2954
18. WALKER, R.J. a L. HOLDEN-DYE. Anthelmintic drugs. [online]. 2007 [cit. 2015-01-28]. Dostupné z: http://www.wormbook.org/chapters/www_anthelminticdrugs/anthelminticdrugs.pdf
19. SCENIHR. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. [online]. 2009 [cit. 2015-01-28]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf
20. WHO. *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2004*. Vyd. 1. Switzerland: World Health Organization, 2009, ISBN 978 92 4 154796 3
21. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. CAS REGISTRY - The gold standard for chemical substance information. In: *cas.org* [online]. 2015 [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: <http://www.cas.org/content/chemical-substances>
22. JUNQUERA, P. Chemical classes of veterinary parasitocides. In: *parasitipedia.net* [online]. 2014 [cit. 2015-03-12]. Dostupné z: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2445&Itemid=2703

23. JUNQUERA, P. Collars impregnated with insecticides for the control of fleas, ticks, mites, lice and flies on dogs and cats. In: *parasitipedia.net* [online]. 2015 [cit. 2015-02-28]. Dostupné z: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2420&Itemid=2691
24. ŠUTA, M. *Chemické látky v životním prostředí a zdraví*. Vyd. 1. Brno: ZO ČSOP Veronica, 2008, ISBN 978-80-87308-00-4
25. Regulating Biopesticides. In: *epa.gov* [online]. 2014 [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/>
26. GOOSE, J. *Carbamate pesticides: a general introduction: environmental health criteria 64*. Geneva: WHO, 1986, ISBN 92 4 154264 0
27. CROSBY, D.G., E. LEITIS a W.L. WINTERLIN. Carbamate Insecticides, Photodecomposition of Carbamate Insecticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1965, roč. 13, č. 3, s. 204-207.
28. KAMRIN, M.A. *Pesticide profiles: toxicity, enviromental impact, and fate*. Vyd. 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997, ISBN 9781566701907
29. EXTOWNET. Propoxur. In: *Extension Toxicology Network* [online]. 1996 [cit. 2015-02-21]. Dostupné z: <http://extownet.orst.edu/pips/propoxur.htm>
30. INCHEM. Data sheets on pesticides No. 25: Propoxur. In: *incchem.org* [online]. 1976 [cit. 2015-01-12]. Dostupné z: http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest25_e.htm
31. JUNQUERA, P. Insect growth regulators - IGRs - for veterinary use on dogs, cats and livestock against external parasites. In: *parasitipedia.net* [online]. 2015 [cit. 2015-02-26]. Dostupné z: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2698&Itemid=2952
32. BOURNE, D. Methoprene (Insecticide). In: *wildpro.twycrosszoo.org* [online]. 2015 [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: <http://wildpro.twycrosszoo.org/S/00Chem/ChComplex/metho.htm>
33. *Methoprene Pesticide Registration Standard*. 1982, US EPA: Washington, DC: Office of Pesticides and Toxic Substances.

34. EXTTOXNET. Methoprene In: *Extension Toxicology Network* [online]. 1995 [cit. 2015-02-21]. Dostupné z: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/haloxyp-methylparathion/methoprene-ext.html#18>
35. COX, C. Insect fast sheet: Fipronil. *Journal of pesticide reform*. 2005, roč. 25, č. 1, s. 10-15.
36. AGROW. Rhone-Poulenc Agro to boost fipronil production. In: *agra-net.net* [online]. 1997 [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: <https://www.agra-net.net/agra/agrow/rhone-poulenc-agro-to-boost-fipronil-production--1.htm>
37. MACBEAN, C. *The Pesticide Manual*. Vyd. 16. UK: British Crop Production Council, 2012, ISBN 978 1 901396 86 7
38. FAO a WHO. *Pesticide Residues in Food - 1997. Report*. Vyd. 1. Rome: FAO and WHO, 1998, ISBN 92-5-104116-4
39. MOHAMED, F., L. SENARATHNA, A. PERCY, M. ABEYEWARDENE, et al. Acute Human Self-poisoning with the N-Phenylpyrazole Insecticide Fipronil a GABA-Gated Chloride Channel Blocker. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2004, roč. 42, č. 7, s. 955-963.
40. WAINAINA, M.G. *Pyrethrum flowers : production, chemistry, toxicology, and uses. Pyrethrum Flowers - Production in Africa* Vyd. 1. New York: Oxford University Press, 1995, ISBN 0195082109
41. US EPA, *Permethrin Facts (Reregistration Eligibility Decision (RED) Fact Sheet)*. 2006, Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC.
42. WHO, *PERMETHRIN HEALTH AND SAFETY GUIDE*. 1989: Geneva.
43. LINNETT, P.J. Permethrin toxicosis in cats. *Australian Veterinary Journal*. 2008, roč. 86, č. 1-2, s. 32-35.
44. TISCH, M., P. SCHMEZER, M. FAULDE, A. GROH, et al. Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2002, roč. 259, č. 3, s. 150-153.
45. SCHNITZERLING, H.J., J. NOLAN a S. HUGHES. Toxicology and metabolism of isomers of flumethrin in larvae of pyrethroid-susceptible and resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*. 1989, roč. 6, č. 1, s. 47-54.

46. JUNQUERA, P. Flumethrin: safety summary for veterinary use on dogs, cats, cattle, sheep, goats, horses and poultry. Poisoning, intoxication, overdose, antidote. In: *parasitipedia.net* [online]. 2014 [cit. 2015-02-06]. Dostupné z: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2677&Itemid=2994
47. FDA. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act). In: *fda.gov* [online]. 2011 [cit. 2015-01-31]. Dostupné z: <http://www.fda.gov/regulatoryinformation/legislation/FederalFoodDrugandCosmeticActFDCA/default.htm>
48. FDA. Pesticide Analytical Manual (PAM). In: *fda.gov* [online]. 2013 [cit. 2015-03-03]. Dostupné z: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006955.htm>
49. OECD, *Guidance document on pesticide residue analytical methods*. 2010.
50. SPHON, J.A. Use of mass spectrometry for confirmation of animal drug residues. *J Assoc Off Anal Chem*. 1978, roč. 61, č. 5, s. 1247-52.
51. STANLEY, C.T., J. Gas chromatographic method for residues of baygon and its major metabolite in animal tissues and milk. *J Agric Food Chem*. 1972, roč. 20, č. 6, s. 1269-73.
52. DAWSON, J., D. HEATH, J. ROSE, E. THAIN, et al. Excretion by humans of phenol derived in vivo from arprocarb. I. Determination by gas chromatography. II. Colorimetric determination. *Bulletin of the World Health Organization*. 1964, roč. 30, č. 1, s. 127-134.
53. VAN GILS, W.F. Spectrophotometric determination of propoxur residues on vegetable matter. *Analyst*. 1970, roč. 95, č. 1126, s. 88-90.
54. FREI, R.W. a J.F. LAWRENCE. Fluorogenic labelling of carbamates with dansyl chloride : IV. In situ quantitation of N-methyl carbamate insecticides on thin-layer chromatograms. *Journal of Chromatography A*. 1972, roč. 67, č. 1, s. 87-95.
55. WHO a FAO. *Pesticide residues in food - 2005: Evaluations. Part I - Residues : joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and environment and the WHO core assessment group, Geneva, Switzerland, 20-29 September 2005*. Vyd. 2. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations: World Health Organization, 2005, 483 s. ISBN 92-5-105488-6

56. WANG, S., R.D. ALLAN, A.S. HILL a I.R. KENNEDY. Rapid enzyme immunoassays for the detection of carbaryl and methoprene in grains. *J Environ Sci Health B*. 2002, roč. 37, č. 6, s. 521-32.
57. FLORES-RAMÍREZ, R., L.E. BATRES-ESQUIVEL, F. DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ, I. LÓPEZ-ACOSTA, et al. Development and Validation of an Analytical Method to Determine Fipronil and its Degradation Products in Soil Samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2012, roč. 89, č. 4, s. 744-750.
58. VÍLCHEZ, J.L., A. PRIETO, L. ARAUJO a A. NAVALÓN. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2001, roč. 919, č. 1, s. 215-221.
59. RAVETON, M., A. AAJOD, J. WILLISON, M. CHERIFI, et al. Soil distribution of fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. *Chemosphere*. 2007, roč. 69, č. 7, s. 1124-1129.
60. MORZYCKA, B. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2002, roč. 982, č. 2, s. 267-273.
61. HADJMOHAMMADI, M.R., S.M. NIKOU a K. KAMEL. Determination of Fipronil Residue in Soil and Water in the Rice Fields in North of Iran by RP-HPLC Method. *Acta Chim. Slov.* 2006, roč. 2006, č. 53, s. 517-520.
62. CID, Y.P., T.P. FERREIRA, D.M.V.C. MEDEIROS, R.M. OLIVEIRA, et al. Determination of fipronil in bovine plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. *Química Nova*. 2012, roč. 35, s. 2063-2066.
63. HORIBA, M., A. KOBAYASHI a A. MURANO. Gas-liquid Chromatographic Determination of a New Pyrethroid, Permethrin(S–3151) and Its Optical Isomers. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1977, roč. 41, č. 3, s. 581-586.
64. SIEGEL, M.M., B.E. HILDEBRAND a D.R. HALL. Determination of Permethrin in Environmental Waters by Gas Chromatography-Selected Ion Monitoring-Mass Spectroscopy Using Ion Counting Detection. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 1980, roč. 8, č. 2, s. 107-126.
65. REICHL, J. a M. VŠETIČKA. Encyklopedie fyziky: Katodové a kanálové záření, obrazovka. In: [online]. 2006 [cit. 2014-09-05]. Dostupné z:

<http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/284-katodove-a-kanalove-zareni-obrazovka#>

66. FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie, 1. díl. *Klin. Biochem. Metab.* 2012, roč. 20, č. 41, s. 152-157.
67. LEE, M.S. a M. ZHU. *Mass spectrometry in drug metabolism and disposition: basic principles and applications*. John Wiley & Sons, Inc., 2011, 776 s. ISBN 9780470401965
68. JONES, V. *Manhattan: The Army and the Atomic Bomb*. Vyd. 1. Washington, D.C.: United States Army Center of Military History, 1985.
69. ANDERSSON, C. Mass Spectrometric Studies on Amino Acids and Peptide Derivates. *Acta. Chem. Scand.* 1958, roč. 12, č. 6, s. 1353.
70. ARPINO, P., B.G. DAWKINS a F.W. MCLAFFERTY. Liquid chromatography/mass spectrometry system providing continuous monitoring with nanogram sensitivity. *J Chromatogr Sci.* 1974, roč. 12, č. 10, s. 574-578.
71. NOBELPRIZE.ORG. The Nobel Prize in Physics 1989. In: [online]. 1989 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z:
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1989/
72. VESTAL, M.L. Methods of Ion Generation. *Chemical Reviews* 2001, roč. 101, č. 2, s. 361-376.
73. NOBELPRIZE.ORG. The Nobel Prize in Chemistry 2002. In: [online]. 2002 [cit. 2014-06-25]. Dostupné z:
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/
74. CODY, R.B., J.A. LARAMÉE a H.D. DURST. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Analytical Chemistry*. 2005, roč. 77, č. 8, s. 2297-2302.
75. COOKS, R.G., J.A. LARAMÉE a H.D. DURST. Ambient Mass Spectrometry. *Science*. 2006, roč. 311, č. 5767, s. 1566-1570.
76. DE HOFFMANN, E. a V. STROOBANT. *Mass Spectrometry: principes and applications*. Vyd. 3. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2007, ISBN 978-0-470-03310-4
77. STROHALM, M. Mmass – Open Source Mass Spectrometry Tool *Mmass*. In: *mmass.org* [online]. 2015 [cit. 2015-02-25]. Dostupné z:
<http://www.mmass.org/download>

78. SCIENTIFIC INSTRUMENT SERVICES. Isotope Distribution Calculator and Mass Spec Plotter. In: *sisweb.com* [online]. 2015 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm>
79. STATE OF NEW JERSEY. New Jersey Department of Environmental Protection, Pesticide Control Program's laboratory: Pesticide Spectra. In: *nj.gov* [online]. 2014 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://www.nj.gov/dep/enforcement/pcp/pem-spectra.htm>
80. NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. Methoprene mass spectrum (electron ionization). In: *webbook.nist.gov* [online]. 2015 [cit. Dostupné z: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C40596698&Mask=200>
81. NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. Permethrine mass spectrum (electron ionization). In: *webbook.nist.gov* [online]. 2015 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C52645531&Mask=200>
82. NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. Propoxur mass spectrum (electron ionization). In: *webbook.nist.gov* [online]. 2015 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C114261&Mask=200>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril (acetonitrile)
CAS	servis s chemickými abstrakty (chemical abstracts service)
CSI	inhibitory syntesy chitinu (chitin synthetase inhibitor)
DART	přímá analýza v reálném čase (direct analysis in real time)
DESI	desorpční ionizace pomocí elektrospreje (desorption electrospray ionization)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina (2,5-dihydroxybenzoic acid)
ECD	detektor elektronového záchytu (electron capture detector)
ED	efektivní dávka (effective dose)
EI	ionizace pomocí elektronového nárazu (electron ionization, electron impact)
ESI	ionizující elektro-sprej (electrospray ionisation)
FAD	alergie na bleší kousnutí (flea allergy dermatitis)
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and agriculture organization)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food & drug administration)
GABA	kyselina gama-aminomáselná (gamma-aminobutyric acid)
GC	plynová chromatografie (gass chromatography)
GHS	globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (globally harmonized systém)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
ICP	indukčně vázaná plazma (inductively coupled plasma)
IDI	inhibitory vývoje hmyzu (insect development inhibitors)
IGD	disruptory růstu hmyzu (insect growth disruptors)
IGR	regulátory růstu hmyzu (insect growth regulators)
INCHEM	mezinárodní chemický identifikátor IUPAC (IUPAC international chemical identifier)
IR	infračervená spektroskopie (infrared radiation)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (The international union of pure and applied chemistry)
JHA	analogy juvenilních hormonů (juvenile hormon analoges)
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)

LD	letální dávka (lethal dose) či laserová desorpce (laser desorption)
LDI	laserová desorpce a ionizace (laser desorption/ionisation)
LDMS	laserová desorpční hmotnostní spektrometrie (laser desorption mass spectrometry)
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MMR	multireziduální metody (multiresidual methods)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MSDS	bezpečnostní list (material safety data sheet)
NIST	Národní institut standardů a technologie (National institute of standards and technology)
NPD	dusíkovo-fosforový detektor (nitrogen–phosphorus detector)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for economic co-operation and development)
OSN	Organizace spojených národů (United nations)
PAM	manuál analytických metod pro určování pesticidů (pesticide analytical manual)
RP	reverzní fáze (reverse phase)
SLD	šetrná laserová desorpce (soft laser desorption)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TFA	trifluoroctová kyselina (trifluoroacetic acid)
TI	terapeutický index (therapeutic index)
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)
US EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (United states environmental protection agency)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World health organization)